

Funktionelle Untersuchungen der Multidrug-Resistance-Associated Proteins (MRP) 1 und 2

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dipl. Pharm. Stefan Leyers

aus Kempen (Niederrhein)

Bonn, Mai 2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Wiese

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Gütschow

Tag der Einreichung: 31.05.2009

Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.2009

Erscheinungsjahr: 2009

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Wiese für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit, eine Vielzahl von unterschiedlichen Techniken auszuprobieren und anzuwenden. Seine Anregungen und konstruktiven Kritiken haben zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen.

Herrn Prof. Dr. M. Gütschow danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Korreferats und die Überlassung der Substanzen für die Testung.

Bei Herrn Prof. Dr. U. Jaehde möchte ich mich für die Mitwirkung in der Prüfungskommission danken und die Möglichkeit das Atom-Absorptionsspektrometer benutzen zu dürfen.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Bönisch bedanke ich für seine Mitwirkung in der Prüfungskommission. Weiterhin danke ich Frau Dr. B. Ohlendorf und Herrn H.-G. Häcker für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit im Rahmen von Kooperationen.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Medizinische Chemie II möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Ganz besonderen Dank möchte ich an Frau Dipl. Pharm. J. Wiendlocha, Frau Dr. S. Damayanti und Frau S. Wieschrath für die gute Zusammenarbeit und die tolle Büroatmosphäre bedanken. Für Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, fachlichen Ratschläge und ihr offenes Ohr möchte ich mich ganz besonders bei Frau Dipl. Pharm. K. Sterz bedanken. Bei Herrn Dipl. Pharm. L. Möllmann bedanke ich mich für die Hilfe bei QSAR-Fragen und den unerschöpflichen Nachschub an Substanzen.

Bei meinen Freunden und meiner Familie möchte ich mich für die Unterstützung und die offenen Ohren bedanken. Hier gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, Frau Dr. K. Neumann und Herrn Dipl.-Ing. agr. M. Hanke.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	6
1 Einleitung	14
1.1 ATP-Binding-Cassette Transporter.....	14
1.2 ABC-Transporter Subfamilie A	16
1.2.1 ABCA2: Funktion und MDR.....	16
1.3 ABC-Transporter Subfamilie G	17
1.3.1 ABCG2: Funktion und MDR.....	17
1.4 ABC-Transporter Subfamilie B.....	19
1.4.1 P-gp: Funktion und MDR.....	19
1.4.2 Modulatoren und Substrate von P-gp	21
1.5 Subfamilie C	23
1.5.1 Transportzyklus der ABCC-Subfamilie.....	24
1.5.2 Subfamilie ABCC in der MDR.....	26
1.5.3 Transporter ABCC1 (MRP1).....	27
1.5.4 Transporter ABCC2 (MRP2)	28
1.5.5 Physiologische Funktion von MRP1	29
1.5.6 Physiologische Funktion von MRP2	31
1.5.7 Klinische Relevanz von MRP1 und MRP2 in der Krebstherapie	32
2 Zielsetzung der Arbeit.....	36
3 Methoden.....	38
3.1 Hergestellte Lösungen	38
3.1.1 Phosphatgepufferte-Kochsalzlösung pH 7,4 (PBS).....	38
3.1.2 Krebs-HEPES-Puffer pH 7,4 (KHP)	38
3.2 Zellkultur	39
3.3 Inkulturnahme von Zellen	41

3.4	Kryokonservierung von Zellen	41
3.5	Behandlung der Zellen mit Zytostatika.....	41
3.6	Zelllinien	42
3.6.1	A2780 Wildtyp und A2780 Adr.....	42
3.6.2	2008 Wildtyp, 2008 MRP1 und MRP2	42
3.6.3	MDCKII Wildtyp, MDCKII MRP1 und MDCKII MRP2.....	43
3.7	Bestimmung der Zellzahl und des Zellvolumens.....	43
3.8	Membranpräparation (vereinfacht)	44
3.8.1	Pufferherstellung	44
3.8.2	Vorbereitung der Zellen	45
3.8.3	Durchführung der Membranpräparation	45
3.9	Proteinbestimmungen	46
3.9.1	Grundlagen der Proteinbestimmungen nach Bradford.....	46
3.9.2	Durchführung der Proteinbestimmung nach Bradford	47
3.9.3	Grundlagen der Proteinbestimmung mit Amidoschwarz	47
3.9.4	Hergestellte Lösungen für die Amidoschwarz Proteinbestimmung.....	47
3.9.5	Durchführung der Proteinbestimmung mit Amidoschwarz	48
3.10	SDS-Page und Western-Blot.....	50
3.10.1	Grundlagen der SDS-PAGE und des Western-Blots.....	50
3.10.2	Benötigte Puffer und Lösungen	50
3.10.3	Durchführung der SDS-PAGE	53
3.10.4	Durchführung des Western Blots	54
3.11	5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluoresceindiacetat (CDFD) Uptake Assay.....	57
3.11.1	Funktionsweise des CDFD-Assays	57
3.11.2	Durchführung des CDFD-Assays im FACS®-Röhrchen.....	57
3.11.3	Durchführung des Microplate-CDFD-Assays	58

3.11.4	Funktionsweise der Durchflusszytometrie	59
3.12	Daunorubicin-Efflux-Assay.....	60
3.12.1	Grundlagen des Daunorubicin-Efflux-Assays	60
3.12.2	Durchführung des Daunorubicin-Efflux Assays	61
3.12.3	Datenanalyse des Daunorubicin-Efflux Assays	62
3.13	Calcein-AM-Assay	62
3.13.1	Grundlagen.....	62
3.13.2	Calcein-AM-Assay für MRP1 und MRP2	64
3.13.3	Calcein-AM-Assay für P-gp.....	66
3.13.4	Kombinationsassays mit zwei Modulatoren	66
3.13.5	Datenanalyse der Calcein-AM-Assays	67
3.14	MTT-Assay	68
3.14.1	Funktionsweise des MTT-Assays.....	68
3.14.2	Durchführung des MTT-Assays.....	68
3.14.3	Der MTT-Assay als Kombinationsassay mit zwei Substanzen	70
3.14.4	Datenanalyse des MTT-Assays	71
3.15	Cisplatin-Uptake.....	71
3.15.1	Grundlagen des Cisplatin-Uptakes	71
3.15.2	Grundlagen der flammenlosen Atom-Absorptionsspektroskopie	72
3.15.3	Probenvorbereitung der Cisplatin-Uptake-Versuche.....	72
3.15.4	Kalibrierung der AAS.....	73
3.15.5	Inprozesskontrolle durch Process Quality Control (PQC) – Proben.....	74
3.15.6	Lyse der Zellpellets	75
3.15.7	Durchführung der AAS-Messung	75
3.15.8	Datenanalyse des Cisplatin-Uptakes	76
3.16	Bestimmung des intrazellulären Glutathiongehalts und des Glutathion-Effluxes.....	76

3.16.1	Grundlagen der Glutathion-Bestimmung	76
3.16.2	Herstellung der Kalibriergeraden	77
3.16.3	Herstellung der Qualitätskontrollen	78
3.16.4	Durchführung der intrazellulären Glutathionbestimmung	78
3.16.5	Durchführung der Bestimmung des Glutathion-Effluxes.....	80
3.16.6	Datenanalyse der Glutathion-Bestimmungen.....	81
3.17	Allgemeine Methoden der Datenanalyse	81
3.17.1	Statistische Kennzahlen.....	81
3.17.2	Statistische Tests: <i>F</i> - und <i>t</i> -Test.....	83
3.17.3	Korrelationen	84
3.17.4	Ausreißer-Test	85
3.18	Eingesetzte Computerprogramme	85
4	Ergebnisse und Diskussion.....	86
4.1	Charakterisierung der Zelllinien mittels Western-Blot	86
4.1.1	Auswertung der Blots.....	86
4.1.2	Zusammenfassung der Western Blot-Ergebnisse.....	87
4.2	Funktionelle Charakterisierung von MRP2 mittels CDFD.....	89
4.2.1	CDFD-Assay im Röhrchen	89
4.2.2	Zusammenfassung der Ergebnisse der CDFD-Assay Röhrchen-Versuche.....	93
4.3	Funktionelle Charakterisierung mittels Calcein-AM.....	94
4.3.1	Etablierung des Calcein-AM-Assays für MRP1.....	94
4.3.2	Funktioneller Nachweis von anderen Transportproteinen in MRP1 transfizierten Zellen.....	95
4.3.3	Vergleich der biologischen Daten mit Literaturdaten	98
4.3.4	MRP1 Calcein-AM-Assay in MDCKII MRP1 und MDCKII	100
4.3.5	Etablierung des Calcein-AM-Assay für MRP2	103

4.4	Verbindungen vom Benzimidazoltyp (LM-Verbindungen) in Calcein-AM-Assays ...	105
4.4.1	Allgemeiner Aufbau der LM-Verbindungen	105
4.4.2	Biologische Aktivität an MRP1 und MRP2.....	105
4.4.3	Struktur-Wirkungsbeziehungen	112
4.4.4	Inhibitorische Aktivität gegenüber P-gp.....	116
4.5	Dreidimensionale quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (3D-QSAR) der LM-Verbindungen	120
4.5.1	Berechnung der Molekülfelder und Erstellung des 3D-QSAR-Modells.....	121
4.5.2	3D-QSAR-Modelle der LM-Verbindungen.....	124
4.6	Gü-Verbindungen als selektive Modulatoren für MRPs	133
4.6.1	Aufbau der Modulatoren	133
4.6.2	Struktur-Wirkungsbeziehungen für MRP1.....	134
4.6.3	Erstellung eines Pharmakophormodells.....	142
4.6.4	Gü-Verbindungen als Aktivatoren an MRP2	143
4.7	Gü-Verbindungen vom p-Aminobenzoesäure-Typ.....	146
4.7.1	Allgemeiner Aufbau der Modulatoren.....	146
4.7.2	Struktur-Wirkungsbeziehungen für MRP1 und MRP2.....	148
4.8	Allgemeine Diskussion der Ergebnisse der MRP-Inhibitoren	151
4.9	Glutathion.....	156
4.9.1	Halbquantitative Bestimmung des intrazellulären Glutathions.....	156
4.9.2	Etablierung des Glutathion Efflux-Assays.....	162
4.9.3	Einfluss ausgewählter Modultoren auf den Glutathion-Efflux	165
4.10	MRP2 in der Cisplatinresistenz.....	168
4.10.1	MTT-Assay.....	168
4.10.2	Cisplatin-Uptake.....	169
4.10.3	Cisplatin Uptake in Kombination mit BSO	172

4.10.4	Zusammenfassung MRP2 in der Cisplatinresistenz.....	177
4.11	Kombinationsassays zur Charakterisierung des Bindungsverhalten an MRP2.....	177
4.11.1	Dose-Ratio-Auswertung	180
4.11.2	Aufklärung der Anzahl interagierenden Bindungsstellen im Dixon-Plot	182
4.11.3	Enzymkinetischer Auswertungsansatz	186
4.11.4	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Kombinationsassays in MRP2.....	195
5	Zusammenfassung	198
6	Referenzen	202
7	Abbildungsverzeichnis	218
8	Tabellenverzeichnis	228
9	Abkürzungsverzeichnis	232
10	Anhang.....	234
10.1	Zellkultur- und Verbrauchsmaterialien.....	234
10.2	Chemikalienliste	235
10.3	Geräte und Zubehör	236
10.4	CDFD Assay für das MAS des FACS.....	237
10.5	Daunorubicin Efflux-Assays	240
10.5.1	Daunorubicin-Efflux-Assay für ABCB1 und MRP2	240
10.6	Weitere 3D-QSAR-Modelle für die LM-Verbindungen.....	242
10.7	Zytotoxizitätstest ausgewählter Modulatoren	246
10.8	Aktivität der Gü-Verbindungen an ABCB1.....	247
10.9	Auswahl unwirksamer Gü-Verbindungen.....	249
10.10	Testung von Phenylannolon 150E aus Myxobacterium <i>Nannocystis exedens</i>	249
11	Veröffentlichungen	252
	Wissenschaftliche Originalarbeiten.....	252
	Abstrakta/Kongressbeiträge.....	252

Erklärung.....254

Curriculum Vitae.....256

1 Einleitung

1.1 ATP-Binding-Cassette Transporter

Setzt man Zellen kurzfristig giftigen Substanzen aus, so kann dies tödliche Folgen für diese haben. Auf Grund dieser Tatsache haben sich im Laufe der Evolution membranständige Transporter entwickelt, die in der Lage sind, solche Toxine oder Xenobiotica aus der Zelle hinaus zu transportieren. Sie stellen eine Schlüsselrolle beim Schutz der Zelle bzw. bei höheren Organismen des Körpers gegenüber toxischen Verbindungen dar [1, 2].

Unter den unzähligen Efflux und Influx-Transportern, die in Prokaryonten und Eukaryonten bekannt sind, stellen die zur ATP-Binding-Cassette (ABC) gehörigen Transporter eine der größten Familien dar [3]. Die Superfamilie der ABC-Transporter ist im Genom verschiedener Spezies erstaunlich gut konserviert und kommt in allen lebenden Zellen und Organismen vor [1, 4].

Alle diese Proteine haben gemeinsam, dass sie Adenosintriphosphat (ATP) binden und aus der Energie der Hydrolyse zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P_i) einen Transport ausüben können. Diese ATP-Bindungsdomäne oder auch Nukleotidbindungsdomäne (NBD) stellt die Funktionseinheit für die ATP Hydrolyse dar. Eine NBD beinhaltet verschiedene charakteristische und hochkonservierte Motive. Dazu gehören unter anderem das Walker A und B Motiv, die durch 90 -120 Aminosäuren getrennt sind, der Q-Loop und der His-Switch [4, 5].

Ein typischer eukaryotischer ABC-Transporter besteht aus zwei NBDs und zwei membranüberspannende Domänen (membrane spanning domains = MSD). Hierbei kann es sich auch um zwei Halbtransporter (bestehend aus einer MSD und einer NBD) handeln, die sich zu einem Dimer zusammenlagern müssen, um einen funktionsfähigen Transporter zu bilden. Der Aufbau eines typischen eukaryotischen ABC-Transporters ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

Die Struktur eines ABC-Transporters tendiert dazu vom prokaryotischen Einzeller zum Eukaryonten an Komplexität zuzunehmen. So besteht der einfachste prokaryotische Transporter aus nur einer Funktionseinheit (NBD und MSD), während z.B. eukaryotische Multidrug Resistance associated Proteins (MRPs) aus mehreren Funktionseinheiten bestehen.

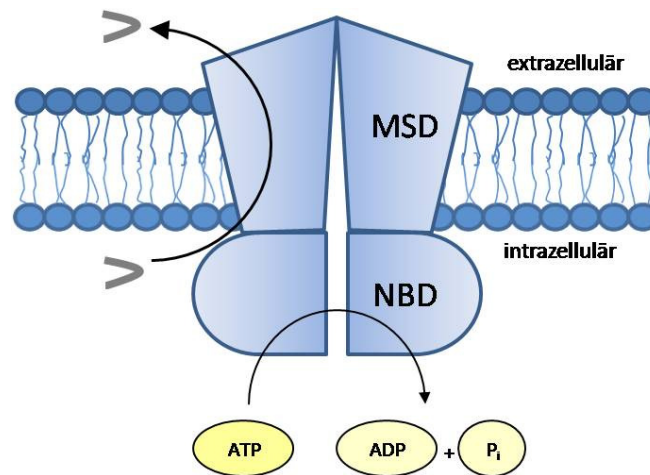


Abbildung 1: Minimalanforderungen an einen ABC-Transporter, bestehend aus vier Domänen: Zwei membranüberspannenden Domänen und zwei Nukleotidbindungsdomänen.

Mitglieder der ATP-Binding-Cassette Transporter Familie transportieren eine erstaunlich hohe Anzahl sehr unterschiedlicher Verbindungen über zelluläre Kompartimente hinweg, darunter unter anderem Zucker, Aminosäuren, Metallionen, Peptide, sogar Proteine und sowohl hydrophobe als auch ionische Verbindungen. Ihre Bedeutung für den Organismus wird auch dadurch deutlich, dass viele Erbkrankheiten bekannt sind, die auf Mutationen in ABC-Transportergenen zurückzuführen sind, so z.B. die zystische Fibrose, die auf eine Mutation des *CFTR1* – Genes zurückgeführt wird oder die Tangier-Krankheit, die auf einer Mutation im *ABCA1* – Gen beruht [6]. Viele Untersuchungen zeigen eine Beteiligung von ABC-Transportern bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapien, der Verteilung von Zytostatika in den Geweben und einen Zusammenhang mit der Toxizität einer solchen Therapie [1, 4].

Bis heute sind 49 humane ABC-Transportergene bekannt. Diese werden in 7 Unterfamilien unterteilt, in denen sie nach Ähnlichkeiten in der Genstruktur (Halb- bzw. Volltransporter), der Anordnung der oben beschriebenen Domänen und der Sequenzhomologie der NBDs bzw. der TMs (transmembranäre Helices) eingeordnet sind. Einige dieser Gene werden nicht mehr abgelesen und bilden somit keine Transporter aus, besitzen jedoch die entsprechenden Gensequenzen eines ABC-Transporters [4, 7].

Die Benennung der Subfamilien ist in Tabelle 1 aufgeführt. Sie gibt die Anzahl der darunter fallenden Transporter an und in ihr sind die Subfamilien farblich markiert, die Einfluss auf eine Krebstherapie nehmen können.

Tabelle 1: Subfamilien der humanen ABC-Transporter mit der Anzahl ihrer Mitglieder. Gelb unterlegt sind die Familien, deren Mitglieder eine Rolle in der Krebstherapie und in der Ausbildung von Resistenzen spielen.

Subfamilie	Anzahl der Transporter
ABCA	12
ABCB (MDR-Transporter)	11
ABCC (MRP-Transporter)	13
ABCD	4
ABCE	1
ABCF	3
ABCG	5

Von Transportern aus vier Subfamilien ist ein Einfluss bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Zytostatika bekannt. Sie können so indirekt den Ausgang einer Krebstherapie beeinflussen. Diese Subfamilien werden mit den Kürzeln ABCA, ABCB (MDR-Transporter), ABCC (MRP-Transporter) und ABCG bezeichnet.

1.2 ABC-Transporter Subfamilie A

Da diese Subfamilie nicht Teil dieser Arbeit ist, soll sie nur kurz der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

Die Subfamilie A besteht aus 12 Volltransportern, die wiederum in zwei Untergruppen unterteilt werden können. Diese Unterteilung richtet sich hier nach ihrer phylogenetischen Entwicklung und ihrer Intron-Struktur. Die erste Gruppe besteht aus sieben Genen, die sich auf sechs Chromosomen aufteilen (*ABCA1-4*, *ABCA7*, *ABCA12*, *ABCA13*). Die anderen fünf Gene (*ABCA5-6*; *ABCA8-10*) liegen auf dem Chromosom 17q24 in Clustern vor [4]. Die meisten dieser Transporter spielen eine Rolle in der Lipid-Verteilung und Lipid-Organisation im Körper. Von den Transportern der Subfamilie A spielt nur der ABCA2 Transporter bei der Entstehung von Resistenzen eine Rolle.

1.2.1 ABCA2: Funktion und MDR

Das *ABCA2* Gen kodiert einen Volltransporter, der aus 2436 Aminosäuren aufgebaut ist. Es ist auf dem Chromosom 9q34 gelegen. Der Transporter wird am meisten im Gehirn, sowie in der Niere und der Leber exprimiert. Seine physiologische Rolle ist weitgehend unbekannt, jedoch wird ihm ein Mitwirken in der Steroid- und Fettverteilung zugesprochen. Des Weiteren soll er

eine Rolle in der Entwicklung der Alzheimer - Erkrankung, einer degenerativen Gehirnerkrankung, spielen [1, 6]. Das vollständige Protein ist in der Lage eine Resistenz gegenüber Estramustin, einem Stickstoff-LOST Derivat mit einer Steroidfunktion, zu verursachen [4, 8].

1.3 ABC-Transporter Subfamilie G

Die Subfamilie G besteht aus sogenannten „reversen“ Halbtransportern. Im Gegensatz zu den anderen ABC-Transportern haben diese die NBD am N-terminalen Ende und die MSD am C-terminalen Ende der Aminosäurekette. Um einen funktionsfähigen Transporter zu bilden, müssen sie dimerisieren [9, 10]. Die Anzahl der zugehörigen Mitglieder der humanen ABCG Subfamilie schwankt zwischen fünf und acht [3, 10]. Die meisten Transporter aus der G-Familie scheinen eine Rolle im Lipid- und im Steroid-Metabolismus zu besitzen (ABCG1, ABCG5 und ABCG8). Während die Funktion für ABCG4 noch unbekannt und die Existenz von ABCG3 in menschlichen Geweben noch umstritten ist, wurde für ABCG2 eine Rolle in der Entwicklung der Multidrug Resistenz (MDR) beschrieben [11, 12].

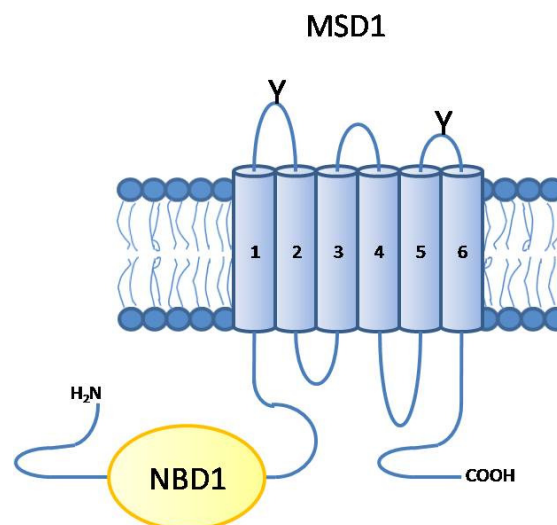


Abbildung 2: Topologie des „reversen“ Halbtransporters ABCG2.

1.3.1 ABCG2: Funktion und MDR

Das Gen für ABCG2 ist auf dem Chromosom 4q22 gelegen. Andere gebräuchliche Namen für den Transporter sind Breast Cancer Resistance Protein (BCRP), Plazenta spezifischer ABC Transporter (ABCP) und Mitoxantrone Resistance Protein (MXR) [13]. Entdeckt wurde der Transporter 1998 von der Arbeitsgruppe um Doyle et al.. Sie züchteten eine resistente Zelllinie mit Doxorubicin unter Anwesenheit des P-GP Inhibitors Verapamil. Diese Zelllinie zeigte eine

hohe Resistenz gegenüber Doxorubicin, ohne P-gp oder ABCC1 zu exprimieren, die zuvor für eine solche Resistenz bekannt waren. ABCG2 ist ein Protein, das aus 655 Aminosäuren aufgebaut und je nach Expressionssystem ein Molekulargewicht zwischen 60 und 72 kDa besitzt. Dieser Unterschied im Gewicht kann wahrscheinlich auf unterschiedliche Glykosilierungsmuster zurückgeführt werden [10, 14]. Wie für die Subfamilie G üblich, ist das Protein ein umgekehrter Halbtransporter, der wahrscheinlich dimerisieren muss, um einen funktionsfähigen Transporter auszubilden [7]. Jedoch ist noch nicht genau geklärt, ob es sich dabei um ein Homodimer, ein Heterodimer oder ein Polymer aus mehr als zwei Untereinheiten handelt. Erste Untersuchungen legen aber einen Homodimer aus zwei ABCG2 Untereinheiten nahe [10, 14, 15].

Im Gegensatz zum ABCA2 Transporter sind für ABCG2 mehrere Zytostatika bekannt, die aus der Zelle hinaus transportiert werden können. ABCG2 kann man somit wirklich als Multidrugresistenz-Transporter bezeichnen. Zu den Substraten aus der Reihe der Tumorthapeutika zählen Mitoxantron, Topotecan, Methotrexat und Imatinib [11, 12].

Für ABCG2 sind Sequenzänderungen in der DNA, sogenannte Polymorphismen, bekannt. So besitzt das Wildtyp-Protein an Stelle 482 einen Arginin-Rest, während andere Stämme dort eine neutrale Aminosäure aufweist. Dieser Austausch bewirkt eine Erweiterung des Resistenzspektrums von ABCG2. Während der Wildtyp keine Resistenz gegenüber Anthrazyklinen und Rhodamin 123 zeigt, sind die Mutanten in der Lage diese zu transportieren [7, 10].

Neben seiner Rolle in der MDR besitzt ABCG2 noch mehrere weitere physiologische Funktionen, die eng mit seiner Expression in den Geweben gekoppelt sind. Im Darm ist es an der apikalen Seite der Zelle angesiedelt; dort schützt es den Körper vor in der Nahrung enthaltenen Toxinen, wie z.B. Pheophorbid A einem Abbauprodukt des Chlorophylls, welches ein Phototoxin darstellt oder dem cancerogenen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin [14]. Auch in der Blut-Hirn-Schranke ist BCRP exprimiert, wo es wahrscheinlich das Gehirn vor toxischen und anderen schädlichen Substanzen schützt. Interessant ist auch das hohe Vorkommen von ABCG2 in Stammzellen, z.B. den blutbildenden Zellen, wo es zwar anscheinend keinen Einfluss auf die Ausprägung der pluripotenten Zellen nimmt, sondern auch hier als Schutzmechanismus gegenüber zytotoxischen Substanzen, die diese wichtigen Zellen abtöten könnten, dient. Diese Tatsache macht die Hemmung von ABCG2 während einer Chemotherapie sehr schwierig, da dadurch eine Sensibilisierung der Stammzellen gegenüber Zytostatika hervorgerufen wird. Auch beim Schutz des Fötus im Mutterleib ist ABCG2 beteiligt, es

wird in großer Zahl in der Plazenta exprimiert, wo es toxische Substanzen abfängt und vom Ungeborenen fernhält. Im Kontrast dazu sekretiert ABCG2, welches im Brustgewebe von stillenden Frauen in erhöhter Anzahl vorliegt, toxische Substanzen in die Muttermilch. Unter diesen Substanzen befinden sich eine Vielzahl von Arzneistoffen (z.B. Aciclovir), und im Fall einer gleichzeitigen Chemotherapie natürlich auch von Zytostatika [14].

1.4 ABC-Transporter Subfamilie B

Im Gegensatz zu den anderen Subfamilien enthält die ABCB-Subfamilie der ABC-Transporter sowohl Voll- als auch Halbtransporter [4]. Bis heute zählt die Subfamilie B vier Volltransporter und sieben Halbtransporter. P-gp war das Gründungsmitglied der B-Familie und wurde aus Krebszellen isoliert [1]. ABCB4 und ABCB11 sind an der Gallensalzsekretion in der Leber beteiligt. ABCB2 und ABCB3 (die sog. TAPs = Transporter associated with antigen processing) sind zwei Halbtransporter, die Heterodimere bilden und Peptide ins Endoplasmatische Retikulum transportieren. Der nächste verwandte Transporter der TAPs ist ABCB9, der an den Lysosomen zu finden ist. Die übrigen ABCB-Transporter (ABCB6, 7, 8 und 10) sind an den Mitochondrien zu finden, wo sie eine Rolle im Eisenmetabolismus sowie im Transport von Vorstufen für eisenhaltige Enzyme spielen [4].

Eine Rolle bei der Entwicklung und Ausprägung von MDR ist in dieser Familie nur für den Transporter P-gp nachgewiesen. Ein möglicher weiterer Kandidat wäre noch ABCB11. ABCB11 ist ein Bilesalzexporter, für den eventuell Paclitaxel ein Substrat darstellt [16]. Aufgrund der geringen Datenlage soll auf ihn aber nicht weiter eingegangen werden.

1.4.1 P-gp: Funktion und MDR

ABCB1, auch MDR1 (Multidrug Resistance Protein) oder P-Glykoprotein (P-gp), ist vermutlich das am besten untersuchte Mitglied der ABC-Superfamilie [17]. Der Transporter wurde 1976 von Juliano und Ling in einer Zelllinie aus chinesischen Hamsterovarien nachgewiesen, die resistent gegenüber Colchicin gezüchtet wurden. Sie machten P-gp für die herabgesetzte Permeabilität der Plasmamembran gegenüber zytotoxischen Substanzen verantwortlich [18]. Daher erfolgte auch die Benennung „P“ aus P-Glykoprotein, die für „Permeability“ steht. Interessant ist, dass Mäuse, Ratten und Hamster über zwei P-Glykoproteine verfügen, während es beim Menschen nur ein Gen gibt, das für ABCB1 kodiert [2].

P-gp kommt fast ubiquitär in allen höheren Spezies vor, was auf eine wichtige und ähnliche Funktion in allen Säugetieren schließen lässt [2], jedoch wurde der Transporter erst 1986 im Menschen nachgewiesen [19].

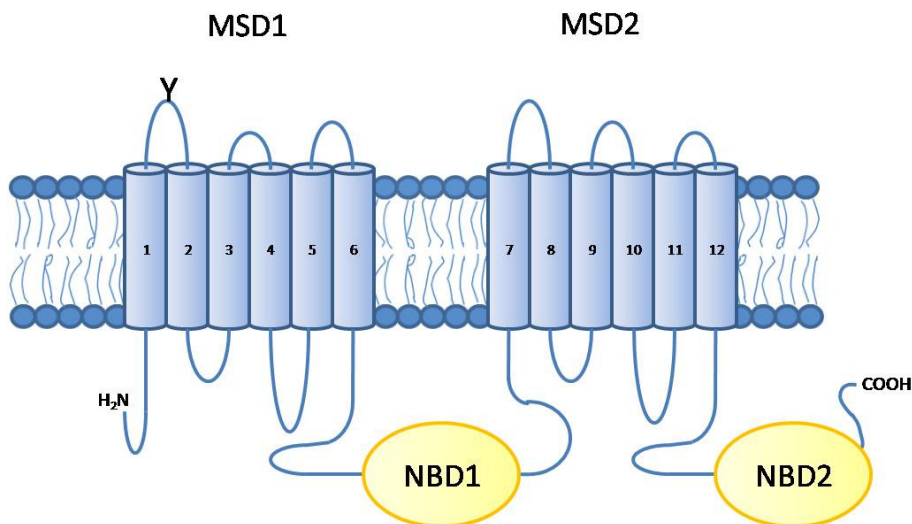


Abbildung 3: Topologie von P-gp oder ABCB1. Es zeigt einen typischen Aufbau eines Säugetier ABC-Transporters

Das *ABCB1* - Gen kodiert einen Transporter, der sich aus insgesamt 1280 Aminosäuren zusammensetzt und in der glykosilierten Form ein Molekulargewicht von etwa 170 kDa und in der unglykosilierten eines von 140 kDa besitzt [1, 20, 21]. P-gp besitzt den typischen vierteiligen Aufbau eines auf den Export von Substanzen ausgelegten ABC-Transporters (siehe Kapitel 1.1). Jeweils eine transmembranäre Domäne und eine Nukleotid-Bindungsdomäne bilden eine Transporterhälfte. Verbunden werden die beiden Teile über ein aus 60 Aminosäuren bestehendes Peptid [19]. N-glykosiliert wird das Protein an drei Asparaginsäuren zwischen TM1 und TM2, jedoch konnte in Mutationsstudien nachgewiesen werden, dass dieses Strukturmerkmal keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins hat [22].

Seit seiner Entdeckung sind sehr viele Untersuchungen an P-gp vorgenommen worden, dennoch konnte bis heute die Funktion nicht vollständig aufgeklärt werden. Zunächst wurde der Schwerpunkt der Forschung auf die durch P-gp vermittelte MDR ausgerichtet. Neuere Studien hingegen richten sich nun viel mehr in Richtung der physiologischen Bedeutung von P-gp und dessen Auswirkungen auf die Pharmakokinetik von Arzneistoffen [12].

1.4.2 Modulatoren und Substrate von P-gp

Um einen genaueren Überblick über die Modulatoren und Substrate von P-gp zu bekommen muss zunächst eine Begriffsdefinition für Modulator und Substrat vorgenommen werden. Als Substrate wurden ursprünglich nur Zytostatika bezeichnet, die durch P-gp transportiert werden. Im Laufe der Zeit war eine Erweiterung des Begriffes „Substrat“ nötig, da auch nicht zytotoxische Substanzen, wie z. B. Calcein-AM, Rhodamin 123 oder Hoechst 33342 als Substrate für den Transporter entdeckt wurden [23].

Unter Modulatoren wiederum versteht man Substanzen, die die Transportfunktion *in vitro* einschränken und so die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den Zytostatika wieder herstellen können, ohne dabei selbst eine zytotoxische Wirkung zu zeigen. Andere gebräuchliche Bezeichnungen für Modulator sind unter anderem: Inhibitor, Reverser, Modifier oder Chemosensitizer [21]. Grundsätzlich sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass diese Unterteilung auch für alle anderen MDR-Transporter gebräuchlich ist.

Tabelle 2: Zusammenstellung von P-gp Substraten und Modulatoren (modifiziert nach [24])

Substrate		Modulatoren	
Substanzklasse	Substanz	Substanzklasse	Substanz
Vincaalkaloide	Vinblastin	1. Generation	Amiodaron
	Vincristin		Chinidin/Chinin
Anthrazykline	Daunorubicin		Cyclosporin A
	Doxorubicin	2. Generation	Nifedipin
	Epirubicin		Verapamil
Epipodophyllotoxine	Etoposid		Dexniguldipin
	Teniposid		Dexverapamil
Taxane	Docetaxel	3. Generation	PSC-833 (Valspodar)
	Paclitaxel		GF120918 (Elacridar)
Kinaseinhibitoren	Imatinib		XR9576 (Tariquidar)
Camptothecine	Irinotecan		R101933 (Laniquidar)
	Topotecan		LY335979 (Zosuquidar)
Verschiedene	Actinomycin D		VX-710 (Biricodar)
	Colchicin		
	Methotrexat		

Neben der vorgestellten klassischen Einteilung werden auch alternative Möglichkeiten zur Definition eines Substrates und Modulators verwendet. Eine davon ist die Unterteilung nach physikalischen bzw. mechanischen Eigenschaften, wobei hier die Diffusionsgeschwindigkeit, mit der die Substanzen die Zellmembran überwinden, den entscheidenden Faktor darstellt [25]. Substrate diffundieren demnach langsam durch die Membran und werden daher effektiv trans-

portiert, während Modulatoren eine hohe Diffusionsgeschwindigkeit aufweisen. Dies führt zu einer raschen Absättigung der P-gp Transportfunktion durch den Modulator und damit zu einem ungehinderten Einstrom des Substrats.

Als einer der ersten klassischen Modulatoren für P-gp wurde 1981 Verapamil entdeckt [26] und es wurde zum ersten Mal in Betracht gezogen, das klinische Problem der MDR durch den Einsatz von Modulatoren zu lösen. Bei P-gp lassen sich die Modulatoren in Modulatoren der ersten, zweiten und dritten Generation unterteilen.

Unter dem Begriff der Modulatoren der ersten Generation versteht man Arzneistoffe, deren Indikation ursprünglich nicht die Therapie maligner Tumore beinhaltete [24, 27]. Neben Calcium-Antagonisten wie Verapamil oder Nifedipin umfasst diese Gruppe auch Arzneistoffe anderer Indikation wie das immunsuppressiv wirkende Cyclosporin A oder das Antimalariamittel Chinin sowie das Antiarrhythmikum Chinidin.

Zur Gruppe der Modulatoren der zweiten Generation zählt man Weiterentwicklungen der Modulatoren der ersten Generation, deren Ursprungswirkung z.B. der Calcium-Antagonismus zu Gunsten der Hemmwirkung an P-gp verschoben wurde. Ein Beispiel für einen Vertreter der zweiten Generation ist Dexverapamil, das R-Enantiomer von Verapamil. Seine Wirksamkeit als Calcium-Antagonist ist deutlich herabgesetzt, während die Hemmwirkung an P-gp verbessert wurde. Ein weiteres Beispiel ist Valspodar oder PSC-388. Es ist ein Derivat des Cyclosporin A, welches neben einer verminderten immunsuppressiven Wirkung *in vitro* auch eine bessere P-gp Inhibition zeigt [28, 29].

Die dritte Generation setzt sich aus Substanzen zusammen, die speziell für den Einsatz als MDR-Modulator konzipiert wurden. Sie verfügen über eine hohe Affinität zu P-gp bei gleichzeitig nur geringfügig ausgeprägten Effekten auf die Pharmakokinetik der eingesetzten Zytostatika [24]. Verbindungen aus allen drei Generationen wurden in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit zur Überwindung der MDR in Tumoren getestet. Die Modulatoren der ersten Generation zeigten in der Regel nur minimale oder keine Effekte. Sie mussten in so hohen Dosierungen eingesetzt werden, dass ihre Toxizität bzw. ihre Nebenwirkungen so hoch waren, dass der Therapieversuch abgebrochen werden musste. Ein therapeutischer Nutzen ließ sich nur für Cyclosporin A und Chinin in klinischen Studien belegen [30, 31].

Auch bei der zweiten Generation der Modulatoren mussten die klinischen Studien aufgrund erhöhter Toxizität abgebrochen werden. PSC-833 zeigte beispielsweise eine Interaktion mit dem für den Abbau von Arzneimitteln wichtigen Cytochrom P450 3A4. Dies führte zu einer

veränderten Pharmakokinetik der Zytostatika, was wiederum die Nebenwirkungen und Wechselwirkungen unberechenbar machte [24] und schließlich zum Abbruch der Testreihe führte.

Die dritte Generation der Modulatoren, die weniger bis keine Wechselwirkungen mit den eingesetzten Zytostatika aufweisen, zeigen (zumindest in Tierversuchen mit immunsupprimierten Mäusen) eine bessere Tumorreduktion im Vergleich zu unbehandelten Mäusen [32]. Dennoch konnten sie in den meisten klinischen Studien aufgrund von hohen Nebenwirkungen nicht überzeugen.

1.5 Subfamilie C

Die C-Familie ist die größte unter den sieben bekannten ABC-Transporter Subfamilien und besteht im Menschen aus 13 Mitgliedern [4, 33, 34]. Darunter fallen 10 MRPs (ABCC1-6 entsprechen MRP1-6 und ABCC10-13 entsprechen MRP7-10), der Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR oder ABCC7) und die Sulfonylharnstoff Transporter SUR1 und SUR2A/B bzw. ABCC8 und ABCC9.

Weiter unterteilen lassen sich die Transporter nach ihrem Aufbau bzw. nach ihrer Größe. Während CFTR, MRP4, MRP5 und MRP8 sowie ABCC13 den typischen Aufbau eines ABC-Transporters mit 2 MSDs bestehend aus je 6 TMs und zwei NBDs zeigen, besitzen die anderen MRPs (mit Ausnahme von MRP9) und die beiden SURs eine weitere MSD am N-terminalen Ende bestehend aus 4-6 zusätzlichen TMs, die mit MSD0 bezeichnet wird [33-36]. In Abbildung 4 ist der Aufbau eines typischen „langen“ Vertreters mit der zusätzlichen Domäne am Beispiel von MRP1 dargestellt. Die MSD0 ist innerhalb der „langen“ Vertreter nicht gut konserviert, jedoch haben alle MSD0 hydrophobe Eigenschaften gemeinsam [33].

Egal ob lange oder kurze Vertreter der MRPs, alle besitzen hochkonservierte Eigenschaften in den NBDs um genau zu sein in NBD1. Diese Eigenschaft ist auch in CFTR und wenn auch weniger ausgeprägt in SUR1 und SUR2 vorhanden, was auf einen gemeinsamen Vorfahren aller ABCC Subfamilien Mitglieder schließen lässt [4, 37].

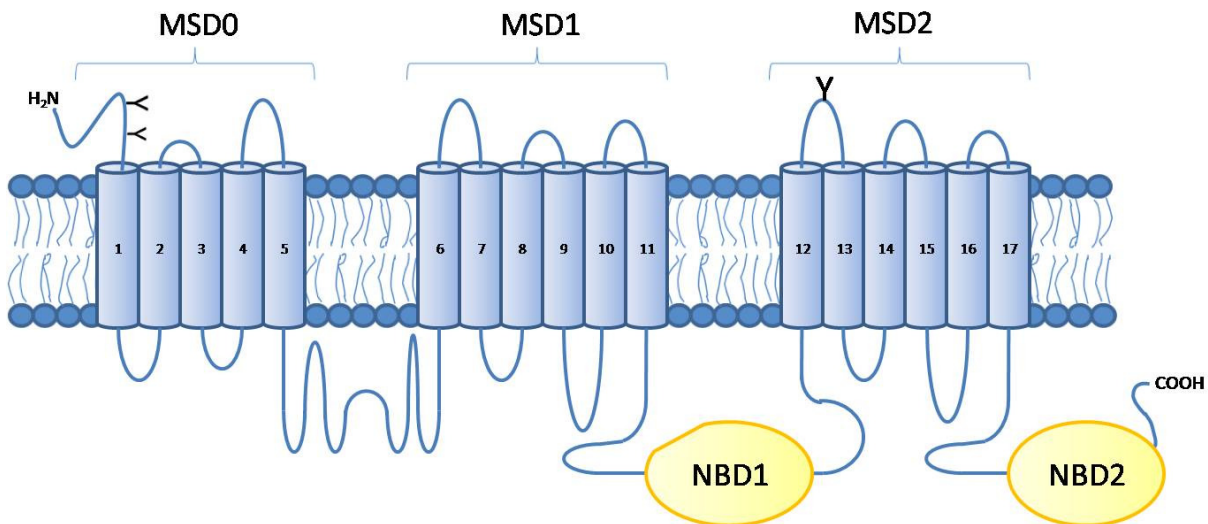


Abbildung 4: Topologiemodell eines typischen „langen“ Vertreters der ABCC Subfamilie am Beispiel von MRP1. Mit „Y“ sind Glykosylierungen gekennzeichnet.

Ein Beispiel für eine solche Veränderung in NBD1 ist die Aminosäure, die dem Walker B-Motiv folgt. Bei den meisten ABC-Transportern ist diese Aminosäure Glutamat. Dieses Glutamat ist verantwortlich für die Spaltung der β - γ Phosphodiesterbindung von ATP [38]. Bei der Subfamilie C ist das Glutamat in NBD2 vorhanden, während es in den meisten ABCC Transportern in NBD1 durch Aspartat ersetzt wurde. Eine Ausnahme bildet CFTR, wo diese durch Serin ausgetauscht wurde. Ein weiteres Beispiel und wohl auffälligster Unterschied für eine veränderte NBD1 der MRPs und CFTR gegenüber den anderen Subfamilien ist das Fehlen von 10 bis 13 Aminosäuren im Spacer zwischen Walker A und der ABC-Signatur im Vergleich zur NBD2 und anderen ABC-Transportern wie z.B. P-gp. Diese charakteristischen Unterschiede haben natürlich Auswirkungen auf die ATP-Hydrolyseeigenschaften der Proteine und weisen den NBDs unterschiedliche Rollen im Transportzyklus der ABCC-Subfamilie zu [39, 40].

1.5.1 Transportzyklus der ABCC-Subfamilie

Der Transportmechanismus der MRPs ist nicht endgültig aufgeklärt. Es existiert aber eine Theorie, die den Transport erklären könnte. An dieser Stelle soll dieser Transportzyklus erläutert werden. In Abbildung 5 ist der Transportmechanismus ohne Beteiligung der MSD0 im Transportgeschehen am Beispiel von Leukotrien C₄ (LTC₄) dargestellt und wurde 2005 von R. G. Deeley et al. vorgestellt [33]. Das Modell orientiert sich stark an dem ATP-Switch Modell, das von C. F. Higgins und K. J. Linton entwickelt wurde [41]. Es enthält jedoch einige Modifi-

kationen, um den besonderen strukturellen Merkmalen der ABCC Subfamilie gerecht zu werden. Des Weiteren gibt es einen zweiten theoretischen Transportmechanismus, der dem hier vorgestellten stark ähnelt. Der einzige Unterschied besteht darin, dass eine Beteiligung von MSD0 inklusive des Linkers zu MSD1 (L_0) als Bindungsregion mit einbezogen wurde, während er in diesem Modell der Übersichtlichkeit und Einfachheit wegen weggelassen wurde [36]. Im ersten Schritt bindet das Substrat (mit und ohne Beteiligung von GSH, siehe Kap. 1.5.5) an eine der oder an die Bindungstasche und verursacht eine Konformationsänderung, durch die die Affinität von ATP zur NBD1 erhöht wird. In Schritt zwei bindet das ATP an die NBD1 und stabilisiert die Interaktion der beiden NBDs durch Ausbilden eines Kontaktes mit der C-Signatur von NBD2, welches die Bindung eines zweiten ATP-Moleküls möglich macht.

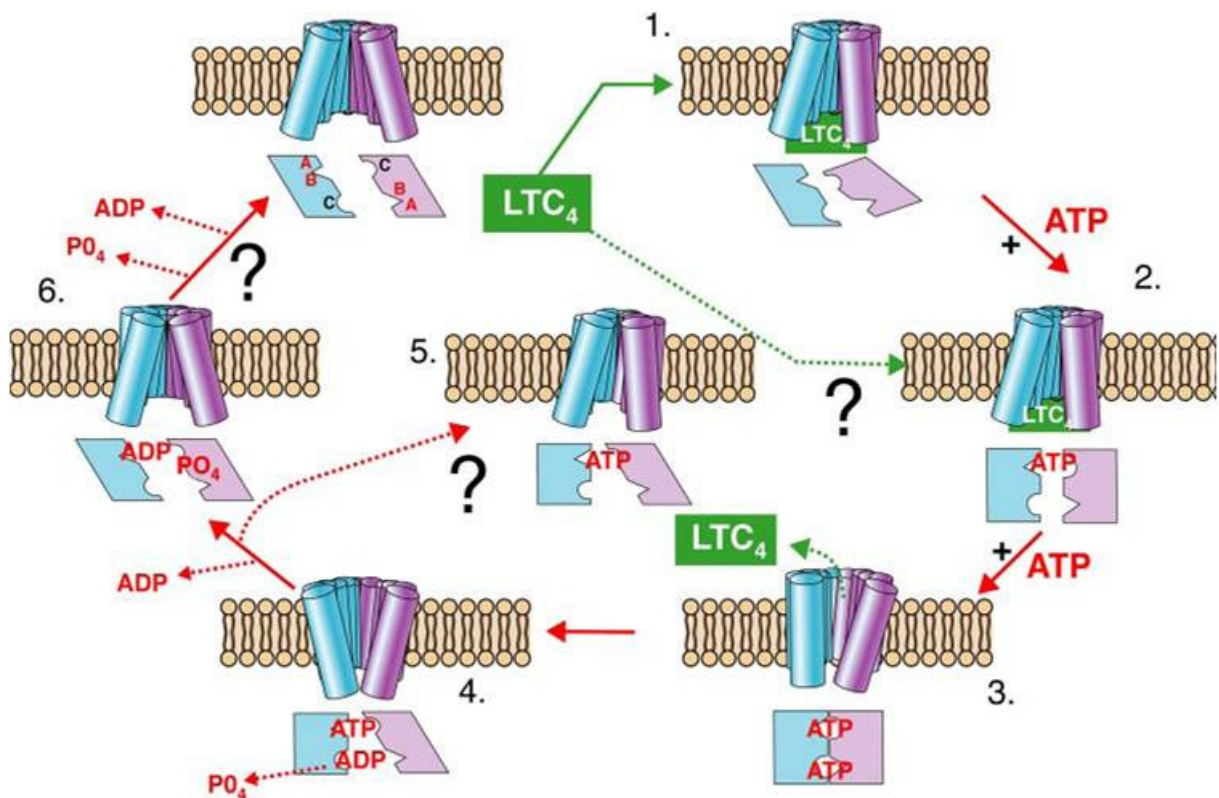


Abbildung 5: Modell des hypothetischen Transportzyklus der MRPs am Beispiel von MRP1. Abgebildet sind die hypothetischen Schritte. MSD1-NBD1 sind blau, während MSD2-NBD2 in violett dargestellt sind. MSD0 ist aus Einfachheitsgründen weggelassen worden Mit „?“ gekennzeichnete Pfeile stellen noch nicht bewiesene, potentielle Wege dar, die aus der inaktiven NBD resultieren. Aus [33].

In Schritt drei wird durch die Einlagerung des zweiten ATP-Moleküls die geschlossene NBD-Dimer Struktur gebildet und es kommt in NBD2 zu strukturellen Konformationsänderungen. Die Kombination aus Konformations- und Positionsänderung der NBDs durch die ATP-Bindung überträgt sich auch auf MSDs, was zum Affinitätsverlust des Transporters für das

Substrat führt. Im vierten Schritt verbleibt das Protein im sogenannten „Low-Affinity-State“ solange keine Hydrolyse an NBD2 stattgefunden hat. NBD1 bleibt von ATP besetzt, bis NBD2 ADP freigesetzt hat. Obwohl viele experimentelle Daten darauf hinweisen, dass es zu einem „Low-Affinity-State“ kommt [40, 42, 43], bleibt dennoch unklar wie es zur Relaxation an NBD1 kommt. Dies hängt davon ab, ob oder ob keine Hydrolyse an NBD1 möglich ist. In Schritt 5 ist der mögliche Mechanismus dargestellt, wenn NBD1 keine ATPase Aktivität besitzt. Der Ursprungszustand wird dann durch die Freisetzung von ADP an NBD2 alleine oder durch Freisetzung von ADP von NBD2 und ATP von NBD1 wieder hergestellt. In Schritt 6 auf der anderen Seite wird ein Hydrolyse-Schritt an der NBD1 als essentiell für den Erhalt der Ausgangsstruktur erachtet. Diese Hypothese kann dadurch bekräftigt werden, dass auch eine geringe ATPase-Aktivität für NBD1 gemessen werden konnte [33].

1.5.2 Subfamilie ABCC in der MDR

Die Subfamilie C enthält viele Exporter, die eine Rolle in der MDR spielen. Besonders hervorzuheben sind an dieser Stelle die Multidrug Resistance associated Proteins, die sogenannten MRPs. Bei allen wird eine Rolle in der Entwicklung der MDR zumindest vermutet, bei den meisten ist sie belegt.

Tabelle 3: Lokalisation und Rolle der ABCC Subfamilie in der Krebs- und Chemotherapie nach [1] und [33].

Symbol	Transporter	Genlokalisierung	Gewebelokalisierung (Hauptpopulationen)	Rolle in der Krebs und Chemotherapie
ABCC1	MRP1	16p13.1	Lunge, Hoden, Niere, Skelett- und Herzmuskeln, Plazenta etc.	Multidrug Resistenz, sowie als prognostischer Faktor
ABCC2	MRP2	10q24	Leber, Niere, Dünn- und Dickdarm, Gallenblase und Lunge	Multidrug Resistenz, inkl. Cisplatin
ABCC3	MRP3	17q21.3	Adrenaldrüse, Pankreas, Darm, Gallenblase und Plazenta	Multidrug Resistenz in Lungenkrebs und anderen Tumoren
ABCC4	MRP4	13q32	Ovarien, Hoden, Lunge und Darm, Prostata	Nukleosidanaloga-Transport
ABCC5	MRP5	3q27	Ubiquitär	Nukleosidanaloga-Transport und –Resistenz
ABCC6	MRP6	16p13.1	Niere, Leber	Anthrazyklin- und Epipodophyllotoxinresistenz
ABCC11	MRP8	16q12.1	Hoden, Brust	Unbekannte Rolle in Brustkrebs
ABCC12	MRP9	16q11	Hoden, Brust	Unbekannte Rolle in Brustkrebs

In Tabelle 3 ist die Lokalisation und die Rolle der MRPs in der Krebstherapie kurz zusammen gestellt. Die Tabelle gibt einen kurzen Überblick über die Rolle der MRPs in der Krebstherapie und der Entwicklung von Resistenzen. Aus ihr geht aber auch hervor, dass die MRPs in der Lage sind fast alle Chemotherapeutika zu transportieren; von Anthrazyklinen, Platinderivaten bis hin zu Nukleotidanaloga. Auf die einzelnen Transporter soll an dieser Stelle jedoch nicht eingegangen werden. Eine genauere Charakterisierung wird nur für ABCC1 und ABCC2 gegeben, die in dieser Arbeit Forschungsgegenstand sind.

1.5.3 Transporter ABCC1 (MRP1)

MRP1 wurde 1992 von der Arbeitsgruppe um S. P. C. Cole entdeckt und charakterisiert. Hierzu verwendete sie eine kleinzellige Lungenkrebszelle H69 und züchtete diese über mehrere Monate resistent gegenüber Doxorubicin. Dabei stellte sie fest, dass die erhaltene Zelllinie H69AR ein ähnliches Resistenzprofil aufwies, wie P-gp überexprimierende Zellen, jedoch selbst kein P-gp zeigte. Ein anderer Transporter war für diese Resistenz verantwortlich und er wurde Multidrug Resistance associated Protein (MRP) genannt [44]. Interessant ist, dass MRP1 und P-gp nur in ca. 15-19 % ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen, aber ein sehr ähnliches Resistenzprofil besitzen [36].

Das humane *ABCC1* - Gen ist auf Chromosom 16p13.1 lokalisiert und umfasst mindestens 200.000 Basenpaare mit 31 Exons [45]. Das fertige Protein besteht aus 1531 Aminosäuren und besitzt wie oben erwähnt die für Mitglieder der ABCC Subfamilie typische Deletion von 13 Aminosäuren in NBD1 zwischen Walker A und Walker B [33, 46], wobei die Rolle dieser Deletion noch nicht bekannt ist. Ersetzt man die fehlenden Aminosäuren durch z.B. das entsprechende Stück einer der NBDs von P-gp, so führt dies zu einem Funktionsverlust des Proteins [40]. Aufgebaut ist MRP1 aus 3 MSDs: MSD1 und 2 aus je 6 TM und der zusätzlichen N-terminalen MSD0 mit 5 TM, die sich an Linker L₀ anschließt [47, 48]. Dieser Linker ist wahrscheinlich essentiell für die Transportfunktion von MRP1, wohingegen MSD0 nicht an allen Transportvorgängen beteiligt ist (Vergl. Abbildung 4) [49].

Glykosiliert werden kann MRP1 an drei Aminosäuren: N19, N23 und N1009. Bei vollständiger Glykosylierung hat MRP1 ein Gewicht von 190 kDa wohingegen es unglykosyliert nur ein Gewicht von ungefähr 170 kDa aufweist [50] und dem vorhergesagten Gewicht entsprechen würde, das die Aminosäuresequenz erwarten lässt [44].

1.5.4 Transporter ABCC2 (MRP2)

MRP2 oder ABCC2 war der zweite Vertreter der ABCC Subfamilie. Er wurde um 1996 entdeckt [51, 52], wobei seine Funktion schon zuvor in Rattenleberpräparationen nachgewiesen und bestimmt werden konnte. Eine andere Bezeichnung für MRP2 ist cMOAT, was so viel bedeutet wie „multispezifischer Organischer Anionen-Transporter“ und auf seine Funktion in der Leber zurückgeführt wurde [53].

Innerhalb der humanen ABCC Subfamilie besitzt MRP2 die höchste Übereinstimmung mit MRP1. Sie sind zu ungefähr 50 % der Aminosäure-Sequenzen deckungsgleich. Das humane *ABCC2* – Gen ist auf dem Chromosom 10q24 gelegen [54] und erstreckt sich über 65 kilo Basenpaare. Es besteht aus 32 Exons und einem hohen Anteil an Introns [55].

Der Aufbau entspricht einem typischen humanen ABC-Transporter mit den 2 MSDs jeweils gefolgt von je einer NBD. Wie MRP1 besitzt auch MRP2 eine aus fünf Helices bestehende zusätzliche MSD, die wahrscheinlich für die vollständige Funktion des Proteins mitverantwortlich ist [56]. Im Gegensatz zu MRP1 werden für MRP2 zwei verschiedene Topologie-Modelle diskutiert. Eines entspricht dem von MRP1 (Vergl. Abbildung 4) [57], während das andere in der MSD2 nicht sechs transmembranäre Helices besitzt, sondern nur vier (vergl. Abbildung 6) [53]. Welches der beiden Topologiemodelle den korrekten Aufbau von MRP2 widerspiegelt, bleibt wohl bis zum Erhalt einer Kristallstruktur ungeklärt.

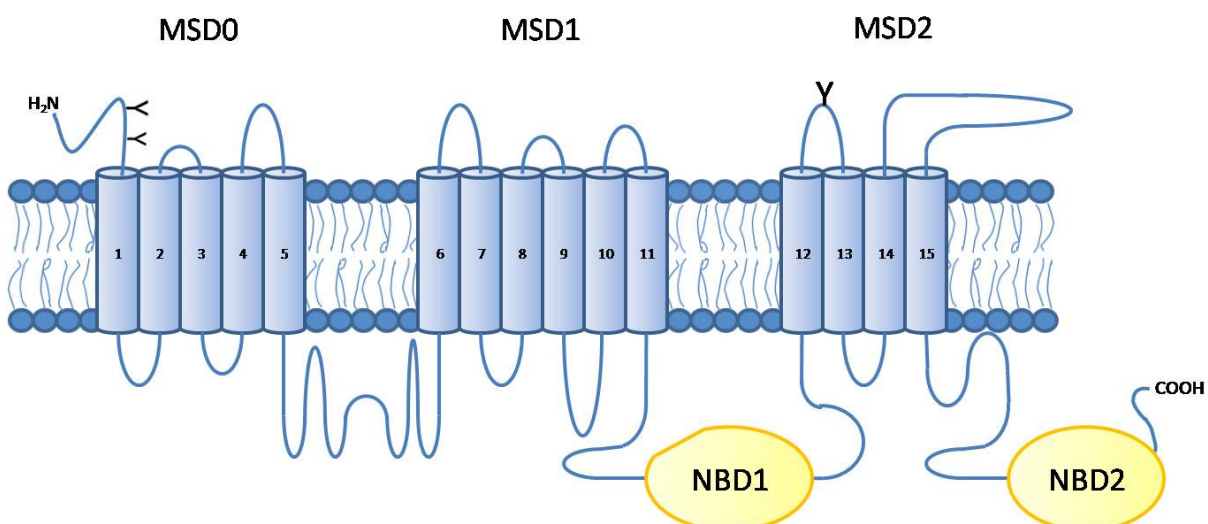


Abbildung 6: Topologiemodell für MRP2 nach Koenig et al. mit nur vier transmembranären Helices in MSD2 [58].

1.5.5 Physiologische Funktion von MRP1

Die physiologische Funktion von MRP1 ist ähnlich wie bei ABCG2 an die Expression im Körper und in den Geweben gebunden. MRP1 kommt in fast allen Geweben und Organen des menschlichen Körpers mit Ausnahme der Leber vor, wo es nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert wird. Am häufigsten jedoch ist MRP1 in der Lunge, den Hoden, der Niere sowie in Herz- und Skelettmuskeln zu finden [44, 59]. Innerhalb der Gewebe ist die Expression hingegen Zelltyp spezifisch, z.B. kommt es hauptsächlich im Bronchialepithel der Lunge vor [60].

Interessant ist auch, dass die MRP1 Level in proliferierenden Zellen z.B. in der Leber erhöht werden [61], was MRP1 wahrscheinlich die Funktion des Schutzes von sich regenerierenden Geweben zukommen lässt.

In polarisierten Endothel- und Epithelzellen wie zum Beispiel der Lunge und den Testis ist MRP1 basolateral lokalisiert, während der Einbau in der Blut-Hirn-Schranke hingegen apikal in die Membran erfolgt. Diese Ausrichtung der MRP1 Expression erzeugt pharmakologische „Schutzzonen“. Die Gewebe hinter dieser Zone sind vor toxischen Substanzen geschützt, sodass man MRP1 eine Gewebeschutzfunktion zuweisen kann [61, 62]. Aus dieser Überlegung heraus ist der Einsatz von MRP1-Inhibitoren in der Krebstherapie umstritten, da durch Ausschalten der Barrierefunktion z.B. in der Blut-Hirn-Schranke die toxischen Nebenwirkungen einer Krebstherapie deutlich erhöht werden.

MRP1 transportiert aber nicht nur unmodifizierte Xenobiotika, sondern auch deren konjugierte Metabolite. Diese Metabolite sind eher typische MRP1 Substrate, da MRP1 besonders Glukuronide und Sulfate sowie Glutathionkonjugate transportiert. In der Regel werden Xenobiotika enzymatisch metabolisiert, um diese zu entgiften. Deshalb macht es auf den ersten Blick keinen Sinn, dass diese Substanzen sofort transportiert werden. Jedoch sind einige dieser Metabolite immer noch selbst toxisch. Des Weiteren führt eine Anreicherung der Metabolite innerhalb der Zelle zur Rückwandlung der Stoffe durch hydrolytische Enzyme oder es kann zur Produktinhibition der konjugierenden Transferasen kommen. Als Folge dessen soll MRP1 Hand in Hand mit in der Phase III metabolisierenden Enzymen arbeiten, um die Konzentration von potentiell toxischen Metaboliten möglichst gering zu halten [61]. Beispiele für von MRP1 transportierte Metaboliten, die gekoppelt sind an die Funktion von Exkretionsenzymen, sind: 4-Nitrochinolin-1-oxid [63] oder Chlorambucil [64]. Eine Übersicht über Substrate und ihre Abhängigkeit von Konjugationen ist in Tabelle 4 gegeben.

MRP1 scheint auch eine Schutzfunktion gegenüber Schwermetallsalzen aus zu üben, so zeigten mit dem *ABCC1* – Gen transfizierte Zelllinien eine geringe Anfälligkeit gegenüber Antimon- und Arsenoxiden, deren Ausschleusung wahrscheinlich durch Komplexierung mit Glutathion angeregt wird [65].

Tabelle 4: MRP1 Substrate und ihre Abhängigkeit von Metabolisierung und Glutathion nach [61]

GSH-abhängig oder -stimuliert	GSH-Konjugate
Vincristin, Aflatoxin B ₁ , Estron-3-sulfat, Daunorubicin	Leukotrien C ₄ , Ethacrinsäure, (S)-2,4-Dinitrophenol, Metachlor, Chlorambucil, Melphalan, N-Ethylmaleimid, Glutathiondisulfid, 4-Hydroxynonenal
Glukuronid-Konjugate	Andere
17-β-Estradiol-17-(βD-Glukuronid), Etoposid, Bilirubin (Mono- und Diglukuronid),	Methotrexat, Leukotrien D ₄ , Leukotrien E ₄ , Folsäure, Glutathion

Zusätzlich zu seiner Rolle als Schutzmechanismus gegenüber toxischen Stoffen, könnte MRP1 noch eine Funktion im Schutz vor oxidativem Stress haben. Während oxidativen Stresses steigt die intrazelluläre Konzentration der oxidierten Form des Glutathions (GSSG) an, was dazu führt, dass reaktive Schwefelwasserstoffgruppen mit einem Glutathion gekoppelt werden. Einige dieser reaktiven Schwefelwasserstoffgruppen sind auf regulatorische Enzyme gelegen, die ihrerseits nach Glutathionkopplung weitere Stressantwortmechanismen in Gang setzen können. MRP1 ist in der Lage GSSG zu transportieren und so GSSG Schwankungen in der Zelle abzuf puffern, die ansonsten eine Stressantwort auslösen würden. Des Weiteren könnten viele Substanzen, die reaktiven Sauerstoffspezies freisetzen, als Teil ihrer Detoxifikation an Glutathion gebunden und danach über MRP1 hinaus transportiert werden [61]. Ein Beispiel für eine solche Substanz ist das 4-Hydroxynonenal. Es ist ein Abbauprodukt der Fettsäuren, das hauptsächlich bei oxidativem Stress gebildet wird. Renes et al. konnten in ihren Studien belegen, dass dieses an Glutathion gekoppelt und durch MRP1 transportiert wird. Daraus schlossen sie, dass MRP1 einen Schutzmechanismus gegenüber oxidativem Stress darstellt [66]. MRP1 ist also in der Lage eine große Anzahl an sehr unterschiedlichen Substanzen und Verbindungen natürlicher und synthetischer Natur zu transportieren, und greift so in verschiedenste Prozesse im menschlichen und auch tierischen Körper ein. Vollständig aufgeklärt ist seine Bedeutung jedoch noch nicht.

1.5.6 Physiologische Funktion von MRP2

MRP2 wird im Gegensatz zu MRP1 nur an der apikalen Seite von polarisierten Zellen exprimiert und kommt am häufigsten in der Leber, im Darm, der Galle und Gallenblase sowie in den Nieren vor. Neuere Studien zeigten jedoch auch eine Ausbildung des Proteins in der Blut-Hirn-Schranke und der Plazenta, wo es wohl dem Schutz des Gehirns bzw. des Ungeborenen dient [67, 68].

Wie MRP1 ist auch MRP2 in der Lage eine hohe Anzahl sehr unterschiedlicher endogener und exogener Substanzen zu transportieren (siehe Tabelle 5), dabei ist die Substratspezifität der beiden Transporter zwar fast identisch, jedoch unterscheiden sie sich in ihrer Affinität [53]. So transportieren z.B. beide Transporter sowohl LTC₄ als auch Bilirubinkonjugate, jedoch bevorzugt MRP2 Bilirubinkonjugate [69], während MRP1 eher LTC₄ transportiert [70].

Tabelle 5: Ausgesuchte MRP2 Substrate (modifiziert nach [71]).

Physiologische Verbindungen	Exogene Verbindungen
Glutathion	<u>Zytostatika:</u> Doxorubicin, Etoposid, Methotrexat, Mitoxantron, Cisplatin, Vincristin, Vinblastin, Camptothecin
Leukotriene C ₄ , D ₄ , E ₄	<u>HIV-Therapeutika:</u> Indinavir, Ritonavir, Saquinavir, Adeovir, Cidofovir, Nelfinavir
Konjugierte Gallensalze	<u>Antibiotika:</u> Ampicillin, Cefodizim, Ceftriaxon, Grepafloxacin, Irinotecan, Azithromycin
Bilirubin-Glukuronide	<u>Weitere Substanzen:</u> Pravastatin, Temocaprilat, Indometacin, Phenobarbital, Sulfipyrazon
Steroide	<u>Toxine:</u> Ochratoxin, Schwermetallkomplexe (Arsen, Antimon, Zink, Kupfer, Mangan, Cadmium)

Die Rolle von MRP2 in der Ausschleusung von Bilirubinkonjugaten wird auch dadurch verdeutlicht, dass es durch Mutationen in MRP2 zu einer Erbkrankheit kommt, dem Dubin-Johnson-Syndrom.

Das Dubin-Johnson-Syndrom wurde 1954 zum ersten Mal charakterisiert, wobei die Ursache noch nicht bekannt war. Es ist eine autosomale rezessive Erbkrankheit, bei der die Leber und die Galle nicht in der Lage sind Bilirubinkonjugate zu transportieren, wodurch es zur Verfärbung der Hepatozyten nach blau-schwarz bis schwarz kommt. Ursache hierfür ist das Fehlen

von MRP2 in der apikalen Membran der Leberzellen. Einen Einfluss auf die Lebensspanne bzw. die Lebensqualität der betroffenen Patienten hat diese Mutation jedoch nicht [72].

Neben der Ausscheidung von Bilirubin aus der Leber kommt MRP2 schon aufgrund seiner Lage in den Membranen eine Schutzfunktion der dahinter gelegenen Gewebe zu. Für den Darm konnte zum Beispiel ein Schutz gegenüber cancerogenen Stoffen aus der Nahrung gezeigt werden. 2-amino-1-methyl-6-imidazo[4;5b]pyridin ist ein solches Toxin aus der Nahrung, das durch MRP2 transportiert wird [73].

Aufgrund seiner ähnlichen Substratspezifität zu MRP1 liegt auch eine Beteiligung an der Resistenzentwicklung während einer Chemotherapie nahe. MRP2 ist ebenfalls in der Lage, eine Vielzahl von Zytostatika zu transportieren (vergl. Tabelle 5). Im Gegensatz zu MRP1 gehört hierzu auch Cisplatin, für das auch eine Korrelation zwischen MRP2-Expression und Therapieerfolg gezeigt werden konnte [54, 74].

Wie für MRP1 sind auch Glutathion und dessen Konjugate, sowie Glukuronide Substrate für MRP2 und es konnte gezeigt werden, dass es mit Phase I und II Enzymen ko-reguliert wird und mit diesen zusammenarbeitet (vergl. auch Kapitel 1.5.5) [75].

Auch ein Zusammenhang bei der Entgiftung von Schwermetallen konnte für MRP2 nachgewiesen werden, neben Arsen- und Antimonkonjugaten sollen auch Cadmium und Quecksilber zu MRP2 Substraten zählen [71, 76].

MRP2 und MRP1 haben somit hohe Überschneidungen sowohl bezüglich ihrer Substrate als auch in ihrer biologischen Funktion. Daneben gibt es auch einige Unterschiede wie z.B. ihre Membran-Lokalisation, ihre Substrataffinität und Expression in den Geweben. Jedoch sind auch bei MRP2 seine Funktion und die dahinter verborgenen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.5.7 Klinische Relevanz von MRP1 und MRP2 in der Krebstherapie

Wie in Kapitel 1.5.5 und 1.5.6 bereits beschrieben, können beide Proteine sowohl MRP1 als auch MRP2 eine Vielzahl verschiedener in der Krebstherapie verwendete Zytostatika transportieren und in ihrer biologischen Funktion den Körper und auch die Gewebe vor solchen giftigen Substanzen schützen. In diesem Kapitel soll es allerdings nicht um die physiologische Rolle dieser MRPs gehen, sondern vielmehr um deren pathologische Funktion und ihre Auswirkungen in der Krebstherapie sowie ihre Expression in verschiedenen Tumoren.

MRP1 ist in einer Vielzahl von verschiedenen soliden und hämatologischen Tumoren nachweisbar. Jedoch ist eine Evaluierung der Signifikanz der Ergebnisse schwierig, da MRP1 häufig schon physiologisch in den entsprechenden Geweben exprimiert ist. Dadurch wird eine Auswertung nur zulässig, wenn auch normales, gesundes Gewebe in die Auswertung mit einbezogen wird [61]. Neben gastrointestinalen und urothelialen Tumoren, Neuroblastomen, Mesotheliomen, Gliomen, Retinoblastomen, Melanomen, Brustkrebs, Gebärmutterhals-, Eierstock-, Hoden-, Prostata- und Schilddrüsenkrebs soll MRP1 besonders häufig in Lungenkrebs, insbesondere der nicht kleinzelligen Variante vorkommen. Einige Studien belegen sogar einen Zusammenhang zwischen der MRP1 Expression und dem Überleben von Patienten mit Lungenkarzinomen und soliden Tumoren im Kindesalter. Jedoch bleiben diese Korrelationen oft kontrovers diskutiert [58, 61, 77].

Eine mögliche Ursache für diese Kontroversität ist der Versuch nur einen Verantwortlichen für das Therapieversagen heranzuziehen. Dabei sind auch viele andere Transporter bekannt, die ebenfalls in der Lage sind, Resistenzen auszulösen (siehe oben). So zeigte eine Arbeitsgruppe um van der Kolk, dass sich eine bessere Vorhersage für das Anschlagen einer Therapie ergibt, wenn man P-gp und MRP1 Expressionen gemeinsam betrachtet [78].

Deshalb verwundert es auch nicht, dass fast nur klinische Studien mit Substanzen durchgeführt wurden, die sowohl MRP1 als auch P-gp inhibieren können. Einige dieser Substanzen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Inhibitoren für MRP1, die in klinischen Studien erprobt werden und wurden. Modifiziert nach [27].

Inhibitor	Name (umgsspr.)	Hersteller	Zielstruktur	Phase
Sulindac	-	Centre Leon Beardsley, France	MRP1	I
XR 9576	Tariquidar	Xenova	P-gp, MRP1	I,II
VX-710	Biricodar	Vertex	P-gp, MRP1	II
MS209	Dofequidar	Schering	P-gp, MRP1	III

Biricodar (VX-710) ist ein Tacrolimusanalogon, das *in vitro* und *in vivo* eine Inhibition von P-gp und MRP1 zeigte. In Phase II Studien konnte eine Wirksamkeitsverbesserung in Kombination mit Doxorubicin und Vincristin nicht belegt werden [79].

Dofequidar (MS209) wurde bis in Phase III Studien verfolgt. In Phase III konnten zumindest leichte Verbesserungen für das Anschlagen einer Therapie in resistenten Tumoren festgestellt

werden, leider waren diese Verbesserungen nicht statistisch signifikant [80]. Zusammengefasst kann man sagen, dass alle klinischen Studien spätestens in Phase III wegen zu hoher Nebenwirkungen oder weil keine Therapieverbesserung gezeigt werden konnte, abgebrochen wurden [27].

Die Rolle von MRP2 in der Krebstherapie ist noch nicht so gut aufgeklärt wie die von MRP1 oder P-gp. Allerdings konnte eine Korrelation zwischen Überleben und MRP2 Expression in akuter myeloider Leukämie bei Erwachsenen und Kindern nachgewiesen werden [71]. Eine Überexpression von MRP2 wurde des Weiteren in Leberkrebszellen, in bösartigen Mesotheliomen [81], sowie Lungen- [82] und Nierentumoren [83] gefunden, jedoch konnte kein Zusammenhang mit dem Überleben von Patienten beobachtet werden.

Aus diesen Untersuchungen wird deutlich, dass sowohl MRP1 als auch MRP2 eine wichtige Rolle bei der Resistenzentwicklung von Tumoren spielen. Eine Möglichkeit diese Resistenz zu überwinden ist die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren von MRP1 und MRP2. Schwierig hierbei ist, dass wie oben schon erwähnt MRP1 und MRP2 ein sehr überschneidendes Substratspektrum besitzen. Des Weiteren haben besonders in Bezug auf MRP2 einige organische Anionen unter bestimmten Bedingungen unterschiedliche Effekte. So können z.B. Indometacin oder Sulfinpyrazon manchmal transportinhibierend oder -stimulierend wirken [71].

Dennoch sollte die Suche nach spezifischen Inhibitoren fortgesetzt, da sie eine vielversprechende Möglichkeit darstellen, die Behandlung von therapieresistenten Tumoren, zu ermöglichen und somit eine erhöhte Lebensquantität und -qualität für den Patienten zu erreichen.

2 Zielsetzung der Arbeit

Der Fokus der Arbeit liegt auf der Untersuchung der Multidrug Resistenz ausgelöst, durch die sogenannten Multidrug Resistance Associated Proteins (MRP) 1 und 2. Zur Charakterisierung dieses Phänotyps sollen verschiedene Ansätze verfolgt werden, sodass wesentlichen Aspekte dieser Resistenzmechanismen untersucht werden können. Hierzu war es nötig neue Methoden zu etablieren und bekannte Methoden anzuwenden bzw. weiterzuentwickeln:

- Der Calcein-AM-Assay soll sowohl für MRP1 als auch MRP2 etabliert und weiterentwickelt, um neu synthetisierte Verbindungen auf ihre modulatorischen Eigenschaften gegenüber diesen Proteinen zu untersuchen.
- Zur Untersuchung der Selektivität der Modulatoren sollen diese auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber dem bekanntesten ABC-Transporter, P-gp untersucht werden.
- Mittels 3D-QSAR sollen Modelle erstellt werden, die einen Einblick in die Struktur-wirkungs-Beziehung der neuen Modulatoren ermöglichen und einen Vergleich der beiden Proteine erlauben.
- Zur Untersuchung des Glutathion assoziierten Transports soll ein Assay entwickelt werden, mit dem es möglich ist diesen Transport zu beschreiben und zu untersuchen.
- MRP2 soll zusätzlich auf seine Rolle in der Cisplatinresistenz untersucht und gegebenenfalls weiter charakterisiert werden, um festzustellen wie diese Resistenz beeinflusst werden kann.
- Zusätzlich soll mittels Kombinationsassays aus den neu gefundenen und bekannten Modulatoren Rückschlüsse auf ihr Bindungsverhalten an MRP2 geschlossen werden.

3 Methoden

3.1 Hergestellte Lösungen

3.1.1 Phosphatgepufferte-Kochsalzlösung pH 7,4 (PBS)

Phosphatgepufferte-Kochsalzlösung (PBS) wurde in der Regel zum Spülen der Zellen verwendet, seltener auch als Grundlage zur Herstellung anderer Lösungen. Der pH-Wert wurde mittels Natronlauge mit einer Konzentration von 0,1 mol/l auf 7,4 eingestellt. Vor Gebrauch wurde der Puffer entweder autoklaviert oder steril filtriert. In Tabelle 7 ist die Zusammensetzung von PBS dargestellt:

Tabelle 7: Zusammensetzung Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS) 1 x

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage [g]
Natriumchlorid	58,44	8,0
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	177,99	1,4
Kaliumdihydrogenphosphat	136,09	0,2
Kaliumchlorid	74,55	0,2
Aqua dest. ad	18,03	1000,0

3.1.2 Krebs-HEPES-Puffer pH 7,4 (KHP)

Krebs-HEPES-Puffer ist aufgrund seiner Zusammensetzung in der Lage Zellen mittelfristig am Leben zu halten, weshalb die meisten Zellversuche in KHP durchgeführt wurden. KHP besitzt im Gegensatz zum Nährmedium den Vorteil, dass seine Zusammensetzung überschaubar und er frei von Enzymen und anderen störenden Proteinen ist.

Da es sehr häufig verwendet wurde, wurde es als fünffach Puffer auf Vorrat hergestellt; in Tabelle 8 ist die Zusammensetzung von KHP 5x aufgeführt. Um den pH-Wert einzustellen wurde 0,5 mol/l Natronlauge verwendet.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Krebs-HEPES-Puffers (KHP) 5 x

Name Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage [g]
Natriumchlorid	58,44	17,250
Kaliumchlorid	74,55	0,876
Kaliumdihydrogenphosphat	136,09	0,408
Natriumhydrogencarbonat	84,01	0,882
Glucose-Monohydrat	198,17	5,790
HEPES (freie Säure)	238,30	5,960
Aqua dest.	18,03	ad 500

Der fünffach konzentrierte Puffer wurde zu jeweils 100,0 ml aliquotiert und bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt. Bei Bedarf wurde ein Aliquot aufgetaut und in einem 500 ml Messkolben mit Aqua dest. aufgefüllt und zusätzlich 650 µl einer 1 molaren Calciumchlorid (CaCl_2)-Lösung sowie 600 µl einer ebenfalls 1 molaren Magnesiumsulfat-heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)-Lösung zugesetzt. Der pH-Wert wurde entweder mit 0,1 mol/l Natronlauge oder 0,1 mol/l Salzsäure auf $\text{pH } 7,4 \pm 0,04$ eingestellt und die Lösung wiederum á 100 ml aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren. Vor Verwendung des Puffers in Assays wurde dieser steril filtriert.

3.2 Zellkultur

Alle Arbeiten, die zur Kultivierung von Zellen dienten, wurden aseptisch unter einer Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt, um eine Kontamination mit Fremdstoffen und anderen Organismen zu verhindern.

Vor Beginn der Arbeit wurde das Nährmedium für ungefähr 15 min im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden je nach benötigter Zellzahl entweder in T175-Gewebekulturflaschen (175 cm²) oder in kleineren T75-Gewebekulturflaschen (75 cm²) herangezogen und bei 37 °C in 5 % CO₂-Atmosphäre mit einer relativen Luftfeuchte von 96 % kultiviert. Das Nährmedium musste alle zwei bis drei Tage erneuert werden, wobei die Häufigkeit von der Konfluenz, der Zelldichte und die Menge des Nährmediums von der Größe der

Gewebekulturflasche abhing. Für die kleineren T75-Gewebekulturflaschen wurden 15-20 ml und für die T175-Gewebekulturtaschen 20-30 ml des entsprechenden Nährmediums verwendet. Je nach Zelllinie wurden spezifische Nährmedien verwendet, die im Kapitel 3.6 näher charakterisiert werden. Entfernt wurde das Medium unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe. Als Indikator, wann das Medium erneuert werden musste, diente das im Medium vorhandene Phenolrot. Phenolrot ist ein pH-Indikator, der im Säuren von rot nach gelb umschlägt. Während des Wachstums der Zellen entstehen im Verlauf des Zitratzyklusses Säuren, die eine Erniedrigung des pH-Wertes bedingen und so zum Umschlagen des Indikators führen. Erreichte der Zellrasen eine Konfluenz zwischen 80-90 %, wurden die Zellen mit Hilfe einer Mischung aus Trypsin und EDTA von den Gewebekulturflaschen abgelöst. Dazu wurde zuerst das Nährmedium entfernt und im nächsten Schritt der Zellrasen mit dem Trypsin-EDTA-Gemisch abgespült, um den Ablösungsprozess behindernde Reste des Mediums zu entfernen. Im Anschluss daran wurde wieder die gleiche Menge des Trypsin-EDTA-Gemisches zugefügt; für T75-Schalen wurden 2 ml und für T175-Schalen 3 ml verwendet. Danach folgte eine kurze Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C um das Temperaturoptimum für die Wirkung des Trypsins zu gewährleisten. Die Inkubationszeit war zellspezifisch und wird in Kapitel 3.6 bei den verwendeten Zelllinien beschrieben. Zur Überprüfung des erfolgreichen Ablösens wurde mit der Handfläche an der Längsseite der Gewebekulturflasche geklopft. War ein deutliches Ablösen der Zellen erkennbar, wurden die Gewebekulturschalen mit Nährmedium auf 10 ml aufgefüllt (T75-Schalen mit 8 ml und T175-Schalen mit 7 ml). Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die restlichen Zellen vom Boden der Schale abgelöst und die entstandene Suspension im Anschluss daran in ein 50 ml-PP-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde durch Zentrifugation bei 266 g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und durch 10 ml trypsinfreies Medium ersetzt. Nach Resuspension durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Zellen wurde das gewünschte Volumen der Zellsuspension in eine neue Gewebekulturflasche überführt, die je nach Fläche entweder 15 ml (T75) bzw. 20 ml (T175) vorgelegtes Nährmedium enthielt. Das Volumen wurde so festgelegt, dass bis zum Erneuten Passagenwechsel mindestens 3 Tage vergingen. Die restliche Zellsuspension wurde zur Durchführung der in späteren Kapiteln beschriebenen Versuche verwendet.

3.3 Inkulturnahme von Zellen

Zur Inkulturnahme der Zellen wurde ein Aliquot dieser aus dem flüssigen Stickstoff bzw. aus dem -80 °C kaltem Gefrierschrank entnommen und rasch in ein 37 °C warmes Wasserbad zum Auftauen gestellt. Währenddessen wurde unter der sterilen Werkbank in eine T75-Gewebekulturflasche 20 ml des entsprechenden Nährmediums vorgelegt, im Anschluss daran die Zellen in die Gewebekulturflasche überführt und bei 37°C und einem Atmosphärengehalt von 5 % CO₂ zum Anheften in den Inkubator gestellt. Das Nährmedium wurde innerhalb der nächsten 24 h gewechselt, um das beim Einfrieren zugesetzte DMSO zu entfernen.

3.4 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben von einer konfluenten Gewebekulturflasche (T75 oder T175) abgelöst. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Vorschrift wurde das entstehende Zellpellet nicht in 10 ml Nährmedium resuspendiert, sondern je nach Gewebekulturflasche entweder in 1,5 ml (T75) oder in 2 ml (T175). Zusätzlich wurde das gleiche Volumen einer Mischung aus FKS (Fetales Kälberserum) und DMSO (Dimethylsulfoxid) im Verhältnis 8 : 2 zugegeben, sodass eine Endkonzentration an DMSO von 10 % enthalten war. DMSO wird zugesetzt, da es die Kristallbildung des Eises, die die Zellmembran zerstören könnte, verhindern soll. Jeweils 1 ml der so erhaltenen Einfriermischung wurde in spezielle Kryoröhrchen überführt.

Zunächst wurden die Zellen in einem -80 °C Gefrierschrank eingefrorenen und im Anschluss daran im flüssigen Stickstoff (Stickstofftank) zur längeren Aufbewahrung gelagert.

3.5 Behandlung der Zellen mit Zytostatika

Grundsätzlich wurden alle Arbeiten mit Zytostatika in einem separaten Labor, dem Zytostatikalarbor unter der Leitung von Prof. Dr. U. Jaehde durchgeführt. In diesem Labor wurden die Zellkulturarbeiten unter einer Werkbank mit Personenschutz realisiert. Mit Zytostatika versehene Gewebekulturflaschen sowie Mikrotiterplatten wurden in einen speziellen Inkubator unter den gleichen Bedingungen (5 % CO₂, 37 °C und 96 % relative Luftfeuchte) kultiviert. An dieser Stelle sollen nicht alle Vorschriften, die zum Umgang mit Zytostatika zu beachten sind, aufgeführt werden. Sie können entsprechenden Literaturstellen entnommen werden [84].

3.6 Zelllinien

3.6.1 A2780 Wildtyp und A2780 Adr

Die Zelllinien A2780 und A2780 Adr wurden bei der European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK) erworben. Die sensitive Zelllinie A2780 (ECACC No. 93112519) ist eine humane, epitheliale Ovarialkarzinomzelllinie, kultiviert von einer unbehandelten Patientin [85]. Die resistente Zelllinie A2780 Adr (ECACC No. 93112520) wurde aus der sensitiven durch kontinuierliches Stressen mit dem Zytostatikum Doxorubicin erhalten. Die Zellen waren zu Beginn der Doktorarbeit schon im Labor vorhanden und in ausreichender Menge kryokonserviert, sodass die Zellen nur noch wie in Kapitel 3.3 beschrieben in Kultur genommen werden mussten. Um den Resistenzgrad der A2780 Adr zu erhalten, konnten die Zellen mit 100 nmol/l Doxorubicin (Endkonzentration im Medium) eine Passage lang behandelt oder eine neue Passage ausgefroren werden. Beide Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in RPMI-1640 Medium mit 10 % FKS und 1 % P/S (Penicillin/Streptomycin) im Inkubator kultiviert. Zum Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA reichten 1 bis 2 Minuten bei Raumtemperatur aus.

3.6.2 2008 Wildtyp, 2008 MRP1 und MRP2

Wie die Zelllinie A2780 ist auch die 2008 eine humane Ovarialkarzinomzelllinie von einer unbehandelten Patientin [35]. Die Zelllinien 2008 MRP1 und 2008 MRP2 wurde durch retrovirale Transfektion mit humaner MRP1 bzw. MRP2 cDNA aus der sensitiven Zelllinie erhalten [86, 87].

Beide Zelllinien wurden uns dankenswerterweise von Prof. Dr. P. Borst (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zelllinien in RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS und 1 % P/S. Zum Ablösen der Zellen mussten diese für ca. 5-10 Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert werden. Die Passagierung wurde bei den transfizierten Zelllinien auf maximal 30 festgelegt, um den Resistenzgrad zu erhalten.

3.6.3 MDCKII Wildtyp, MDCKII MRP1 und MDCKII MRP2

Die Zelllinie MDCK (Madin-Dabin Canine Kidney) stammt aus der Niere eines Cocker Spaniel. Der hier verwendete Subklon MDCKII wurde aus einer späteren Passage der MDCK Zelllinie gewonnen und weist leicht veränderte Eigenschaften auf [88]. MDCKII (ECACC No. 00062107) wurde in D-MEM Medium mit 10 % FKS und 1 % P/S kultiviert, während bei den transfizierten Zelllinien MDCKII MRP1 und MRP2 dem Medium noch 400 µg/ml G-418 (Geneticinsulfat) zugesetzt wurde, um die Resistenz aufrecht zu erhalten. Transfiziert wurden die Zellen im Arbeitskreis von Prof. Dr. P. Borst (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande) [89, 90], der die Zellen freundlicherweise zur Verfügung stellte. Zum Ernten der Zellen wurden sie wie in Kap. 3.2 beschrieben behandelt und im Anschluss für 10-20 min bei 37°C inkubiert.

3.7 Bestimmung der Zellzahl und des Zellvolumens

Zur Bestimmung der Zellzahl und des Zellvolumens wurde das Gerät CASY[®] 1 Model TT verwendet. Es ist ein dem Coulter-Counter verwandtes System, das Zellzahl und -volumen über eine Widerstandsveränderung misst. Hierzu werden aus der in Kap. 3.2 gewonnen Zellsuspension 20 µl entnommen und in 10 ml steril filtrierter Casy[®] ton-Lösung durch Schwenken homogen verteilt. Die Casy[®] ton-Lösung dient als schwacher Elektrolyt, die mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Kapillare mit definiertem Innendurchmesser (150 µm) und definierter Länge fließt. Während der Messung wird durch zwei Platinelektroden eine konstante Spannung über die Kapillarstrecke angelegt, dabei stellt die Kapillare einen definierten Widerstand dar. Unter den hier herrschenden Bedingungen eines konstanten Stromflusses sind Spannung und Widerstand proportional zueinander. Passieren nun Zellen die Kapillare, verdrängen diese so viel Elektrolytlösung wie es ihrem Volumen entspricht. Eine intakte Zelle stellt hier einen Isolator dar, sodass es zu einer Widerstandserhöhung, proportional zur Fläche der Zelle kommt.

Die Amplituden der Messsignale entsprechen der Zellzahl, während die Pulsflächen Aufschluss über das Volumen der Zellen geben. Daraus werden sowohl der maximale und mittlere Zelldurchmesser, als auch das Volumen der Zellen errechnet. Der Zelldurchmesser ist für die einzelnen Zelllinien spezifisch und lässt Rückschlüsse auf die Vitalität der Zellen zu. Für die Messung wurde die untere Messgrenze auf 9,5 µm und die obere auf 40 µm festgelegt. Auf diese Weise werden Zelltrümmer mit einem Durchmesser < 9,5 µm nicht berücksichtigt.

Partikel > 40 µm deuten auf Zellagglomerate hin und kommen durch unzureichende Vereinzelung zustande.

3.8 Membranpräparation (vereinfacht)

3.8.1 Pufferherstellung

Für die Membranpräparation wurden zwei spezielle Puffer benötigt, der Homogenisationspuffer und der Storage-(Aufbewahrungs-)Puffer. Beide wurden aus einer HEPES-Stammlösung (200 mmol/l, pH 7,4) hergestellt. In den folgenden Tabellen ist die genaue Zusammensetzung der Puffer dokumentiert. Der pH-Wert wurde mit 0,1 mol/l Natronlauge eingestellt.

Wichtig für die ersten Schritte der Membranpräparation sind hohe EDTA-Konzentrationen. EDTA komplexiert die in den abbauenden Enzymen enthaltenen und für deren Wirkung essentiellen Metallionen und verhindern so den Verdau von Zellbestandteilen, besonders der Membran und der dort enthaltenen Transportproteine.

Tabelle 9: Zusammensetzung HEPES-Stammlösung (200 mmol/l, pH 7,4)

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage [g]
HEPES-Na-Salz	260,29	17,353
HEPES	238,30	31,773
Aqua dest.	18,03	ad 1000

Tabelle 10: Zusammensetzung Homogenisationspuffer (Puffer 1)

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage [ml] bzw. [g]
HEPES-Stammlsg.	-	50,0
Na ₂ EDTA	336,21	50,0
Aqua dest.	18,03	ad 500,0

Tabelle 11: Zusammensetzung Storage (Puffer 2)

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage [g]
HEPES-Na-Salz	260,29	17,353
Na ₂ EDTA	336,21	0,500
Aqua dest.	18,03	ad 1000

3.8.2 Vorbereitung der Zellen

Im Gegensatz zur normalen Zellkultur wurde aufgrund der Menge der benötigten Zellen die Kultivierung nicht in T175-Gewebekulturflaschen, sondern in Tissue-Cultur-Dishes (TC-Dishes) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen (2008, 2008 MRP1, MDCKII, MDCK MRP1, MDCKII MRP2, A2780, A2780 Adr) ausgehend von einer T75-Gewebekulturschale wie in Kap. 3.2 beschrieben geerntet und jeweils 1 ml der Zellsuspension auf die mit 19 ml Nährmedium befüllten TC-Dishes verteilt. Diese wurden dann im Brutschrank, bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und bei Bedarf das Medium, durch Absaugen des verbrauchten und Zugabe von neuem, gewechselt. Waren die TC-Dishes zwischen 80 und 90 % konfluent wurde mit der Membranpräparation begonnen.

3.8.3 Durchführung der Membranpräparation

Vor Beginn der Arbeit wurden pro 5 TC-Dishes ein 50 ml PP-Röhrchen auf Eis gestellt, um dieses vorzukühlen. Ein hier beschriebener Durchgang umfasst immer 5 TC-Dishes und wurde bei Bedarf wiederholt.

Je TC-Dish wurden 2,4 ml des Puffer 1 (vergl. Kap. 3.8.1) mit einer Pipette zugetropft und im Anschluss daran mit Hilfe eines Zellschabers die Zellen von der Platte abgelöst. Die so entstandene Zellsuspension wurde mit einer Pipette aufgesogen und in ein gekühltes PP-Röhrchen überführt. Um die restlichen Zellen von den Schalen abzulösen wurde jede Schale nochmals mit 2 ml Puffer 1 (durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren) gespült und die Suspension ebenfalls in das PP-Röhrchen überführt. Anschließend mussten die Zellen mit Hilfe eines Polytron-Homogenisators zerkleinert werden. Dazu wurde die Zellsuspension unter die Zerkleinerungsdüse gehalten und dann der Motor langsam auf die Zerkleinerungsstufe hochgefahren, für ca. 12 s gehalten und im Anschluss daran die Geschwindigkeit wieder langsam reduziert.

Hatte sich der entstehende Schaum abgesetzt, wurde der Vorgang nochmals wiederholt, um die Zerstörung der Zellen zu vervollständigen und die gewünschten Membranfragmente zu erhalten.

Die Zellmembranen mussten nun noch von den andern Zellbestandteilen wie Zellkernen getrennt werden. Dies erreichte man durch mehrere Zentrifugationsschritte. Zunächst wurden die Suspensionen in Zentrifugengläser überführt, die den verwendeten g-Zahlen standhalten konnten, und mit Puffer 1 auf 50,0 g austariert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 40.000 g und 2 °C wurde der Überstand abgesaugt, ohne das Pellet zu beschädigen. Um die verbliebenen unerwünschten Zellbestandteile zu entfernen, wurden zwei weitere Zentrifugationsschritte durchgeführt. Hierzu wurden die Zentrifugenröhrchen mit Puffer 2 auf 40,0 g austariert, die Pellets gleichzeitig resuspendiert und für 10 Minuten bei 40.000 g und 2 °C zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes der Vorgang wiederholt.

Das so erhaltenen Membranpellet wurde mit 2,25 ml Puffer 2 pro 5 Schalen resuspendiert, in Eppendorfgefäße zu jeweils 0,250 ml aliquotiert und nach Beschriftung im -80 °C Gefrierschrank bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.9 Proteinbestimmungen

3.9.1 Grundlagen der Proteinbestimmungen nach Bradford

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G250 ist in der Lage in saurer Lösung mit den Seitenketten von kationischen und hydrophoben Aminosäuren in Proteinen Komplexe zu bilden. Dabei wird die kationische Form des Coomassie-Farbstoffes mit einem Absorptionsmaximum von 470 nm in der Sulfonatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum nach 595 nm verschoben.

Im Gegensatz zu anderen gängigen quantitativen Bestimmungsmethoden nach Lowry oder dem Amidoschwarz Assay kann man mit Bradford-Reagenz Proteine in sauren Lösungen quantifizieren, wodurch nach der Lyse der Proben der Cisplatin-Uptakeversuche (Vergl. Kap. 3.15) keine zusätzliche Neutralisierung der Proben erforderlich war.

3.9.2 Durchführung der Proteinbestimmung nach Bradford

Die Durchführung erfolgte nach der Beschreibung für 96-Well Mikrotiterplatten des Herstellers Sigma-Aldrich. Zu Beginn der Arbeit wurde das Bradford-Reagenz aus dem Kühlschrank geholt und vorsichtig geschüttelt, sodass es sich auf Raumtemperatur (RT) erwärmen konnte. Aus dem BSA-Standard wurden Verdünnungen im Bereich zwischen 0,05 bis 1,4 mg/ml hergestellt und die Proben mit Aqua dest. so verdünnt, dass sie im Bereich der Kalibriergeraden lagen. Von den so erhaltenen Probe- und Standardlösungen wurden jeweils 5 µl pro Well im Triplet einer 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert.

In jedes Well wurde mit Hilfe einer Multikanalpipette 250 µl des Bradford-Reagenz gegeben und kurz geschüttelt.

Bei Raumtemperatur wurden die Proben für ca. 10 min inkubiert, sodass sich der Farbkomplex bilden konnte. Die Absorption wurde im POLARstar® bei 595 nm und Raumtemperatur gemessen.

3.9.3 Grundlagen der Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Grundlage für diese Proteinbestimmung ist die Adsorption des Farbstoffes Amidoschwarz 10B an Proteine. Die adsorbierte Farbstoffmenge wird photometrisch bestimmt und korreliert mit dem Proteingehalt der Probe. Der Vorteil der Methode gegenüber den anderen Methoden wie z.B. nach Lowry und Bradford ist eine geringere Störanfälligkeit gegenüber hohen Lipidkonzentrationen und Pufferzusätzen wie z.B. EDTA. Diese Bestimmungsmethode kam zur Bestimmung des Proteingehaltes bei Proben für den Western-Blot (Kap. 3.10) zum Einsatz. Für die 100 prozentige TCA-Lösung wurden 100,0 g TCA eingewogen und mit Aqua dest. zu 100,0 ml aufgefüllt. Die 6 prozentige wurde durch Verdünnung der 100 % TCA-Lösung gewonnen. Beide Lösungen wurden bei 4-8 C aufbewahrt.

3.9.4 Hergestellte Lösungen für die Amidoschwarz Proteinbestimmung

Stammlösung:	Trichloressigsäure-Stammlösungen	
100 ml	100 % Trichloressigsäure(TCA)-Lösung	100 % (m/V)
100 ml	6 % Trichloressigsäure(TCA)-Lösung	6 % (m/V)

Amidoschwarz-Färbelösung		
Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage
Eisessig	60,05	50 ml
Methanol	32,04	225 ml
Amidoschwarz 10B	616,46	1,25 g
Aqua dest.	18,03	Ad 500,0 ml

Entfärbelösung		
Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage
Eisessig	60,05	10 ml
Methanol	32,04	450 ml
Aqua dest.	18,03	Ad 500,0 ml

Tris-SDS-Lösung pH 7,5 (bei Raumtemperatur)		
Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage
Tris	121,14	12,1 g
Natriumdodecylsulfat (SDS)	288,40	2,0 g
Aqua dest.	18,03	Ad 100,0 ml

Die Lagerung der Tris-Lösung erfolgte bei Raumtemperatur.

Elutionslösung		
Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage
EDTA-Natrium	336,21	125 µl
Natriumhydroxid	40,00	2,0 g
Ethanol 50 % (V/V)	-	Ad 500,0 ml

3.9.5 Durchführung der Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Die Durchführung der Proteinbestimmung mittels Amidoschwarz erfolgte in Anlehnung an die von Kaplan et al. beschriebene Methode [91].

Von den Probelösungen wurde ein Volumen abgeschätzt, das einen Proteingehalt zwischen 5 und 10 µg erwarten ließ, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit Wasser auf 225 µl aufgefüllt. Zum Erstellen einer Kalibriergeraden wurde eine BSA-Stammlösung so verdünnt, dass neun Konzentrationen zwischen 0 bis 15 µg Gesamtprotein erhalten wurden.

Zur Solubisation und anschließender Präzipitation der Proteine in den Proben wurden zunächst 30 µl der Tris-SDS-Lösung zugegeben, mit den Proben vermischt und im Anschluss daran 50 µl eiskalte 100 % TCA-Lösung hinzugefügt und gevortext. Die Ansätze wurden mindestens 2 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Zusammenbau des Vakuumblocks wurde ein mit Wasser befeuchtetes Filterpapier in den Block eingelegt, darüber eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran platziert und der Block den Anweisungen des Herstellers folgend zusammengesetzt. Die PVDF-Membran wurde vorher 15 s mit Methanol benetzt und im Anschluss daran 2 min im Wasserbad befeuchtet.

Der fertig zusammengebaute Vakuumblock wurde an die Membranpumpe angeschlossen und ein Unterdruck von 600 mbar angelegt. Die präzipitierten Proben konnten nun in die dafür vorgesehenen Löcher pipettiert werden. Zum vollständigen Auftragen der Proteine wurden die 1,5 ml-Reaktionsgefäße noch mit 200 µl einer 6 % TCA-Lösung gespült und die Spüllösung in die entsprechenden Vertiefungen des Vakuumblocks pipettiert. Zum Abschluss erfolgte eine Spülung der Vertiefung mit 200 µl der 6 prozentigen TCA-Lösung. Die beladene Membran wurde aus dem Block entnommen und angefärbt.

Die sich anschließenden Färbe- und Entfärbeschritte wurden unter ständigem Schütteln der mit der jeweiligen Flüssigkeit bedeckten PVDF-Membran auf dem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur durchgeführt. Als erstes wurde der Färbeschritt ausgeführt. Hierzu wurde die Membran mit 25 ml der Amidoschwarz-Färbelösung für 25 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs für eine Minute in Aqua dest. geschwenkt. Um unspezifisch gebundenen Farbstoff zu entfernen, folgten drei Waschschrte mit je 25 ml frischer Entfärbelösung für eine Dauer von jeweils 3 min. Die Reste der Entfärbelösung wurden durch 3 min Schwenken der Membran in Wasser entfernt.

Die so angefärbten Proteinproben und Standards für die Kalibriergerade wurden mit Hilfe einer Einlochzange aus der Membran ausgestanzt und in ein Pyrex-Glasröhrchen überführt. Der eingelagerte Farbstoff wurde durch Zugabe von 1 ml der Elutionslösung innerhalb von 15 min und Schütteln aus den Membranen eluiert. Die Absorption der Proben wurde bei 630 nm gegen Wasser als Nullwert vermessen.

3.10 SDS-Page und Western-Blot

3.10.1 Grundlagen der SDS-PAGE und des Western-Blots

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld [92]. Zunächst werden Disulfidbrücken mit Hilfe von Dithiothreitol (DTT) gespalten. Die reduzierten Proteine werden in SDS solubilisiert. Dieser Schritt ist notwendig, um die proteinspezifischen Eigenschaften, wie Faltung und Eigenladung, weitgehend zu zerstören bzw. zu maskieren. Nur so kann eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße sichergestellt werden.

Der Western-Blot ist eine immunologische Methode zur Bestimmung von Proteinen mit spezifischen Antikörpern. Die Proteine müssen hierfür zunächst aus dem Gel eluiert werden. Dies geschieht durch Anlegen einer Spannung senkrecht zur Geloberfläche. Dabei bewegen sich die Proteine in Richtung des elektrischen Feldes aus dem Gel heraus und werden dann durch hydrophobe Wechselwirkungen auf eine Membran übertragen und fixiert.

Beim immunbiologischen Schritt kommt es zur Anwendung von zwei Antikörpern. Der erste ist zur spezifischen Markierung des zu untersuchenden Proteins bestimmt und wird auch als primärer Antikörper bezeichnet. Der zweite oder auch sekundäre Antikörper ist gegen den F_C-Teil des primären Antikörpers gerichtet und beinhaltet ein Enzym, das kovalent an den sekundären Antikörper gebunden ist. Zur Detektion wird ein Substrat des Enzyms zugegeben, welches durch Umsetzung z.B. zu fluoreszieren beginnt oder eine spezifische Farbreaktion auslöst.

3.10.2 Benötigte Puffer und Lösungen

Stammlösungen:		
100 ml	Tris-HCl pH 8,8	1 mol/l
100 ml	Tris-HCl pH 6,8	1 mol/l
10 ml	10 % SDS-Lösung	10 % (m/V)
10 ml	Tris-Lösung	20 mmol/l
1 ml	Ammoniumpersulfat(APS)-Lösung	10 % (m/V)
1 ml	Dithiothreitol(DTT)	3,2 mol/l

Die Tris-Stammlösungen wurden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Die SDS-Lösung bei Raumtemperatur. Die APS und DTT-Lösungen wurden am Gebrauchstag immer frisch hergestellt, da sie nicht stabil sind.

Trenngel-Lösung 7,5 %		
Substanz	Molare Masse [g/mol]	Volumen [ml]
Acrylamid 30 %	71,08	3,750
Trenngelpuffer	-	5,625
Aqua dest.	18,03	5,356
SDS 10 %	-	0,150
TEMED	116,20	0,012
APS 10 %	-	0,100

Sammelgel-Lösung		
Substanz	Molare Masse [g/mol]	Volumen [ml]
Acrylamid 30 %	71,08	0,833
Sammelgelpuffer	-	0,625
Aqua dest.	18,03	3,465
SDS 10 %	-	0,050
TEMED	116,20	0,005
APS 10 %	-	0,021

Elektrophoresepuffer-Stammlösung		
Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage [g]
Glycin	75,07	28,80
TRIS-Base	121,14	6,06
SDS	288,60	10,00
Aqua dest.	18,03	ad 1000,00

Die Aufbewahrung des Elektrophoresepuffers erfolgt bei 4-8°C.

3. Methoden

Transferpuffer pH 8,2 - 8,4		
Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage [g]
Glycin	75,07	28,80
TRIS-Base	121,14	6,06
Aqua dest.	18,03	ad 2000,00

Tris-SDS-Lösung pH 7,5 (bei Raumtemperatur)		
Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage/Volumen
Tris	121,14	12,1 g
Natriumdodecylsulfat (SDS)	288,40	2,0 g
Aqua dest.	18,02	ad 100,0 ml

Gesättigte Bromphenolblau-Lösung		
Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage/Volumen
Ethanol 96 % (V/V)	121,14	10,0 µl
Bromphenolblau	669,96	~ 1,0 mg
Aqua dest.	18,02	ad 10,0 ml

Bei der Bromphenolblau-Lösung handelt es sich um eine gesättigte Lösung. Überschüssiger fester Farbstoff wurde durch Zentrifugation entfernt und der Überstand zur Herstellung des Probenauftragspuffer (PAP) verwendet.

Probenauftragspuffer (PAP)		
Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage/Volumen
Tris-HCl pH 6,8	-	1,75 ml
Glycerol	92,10	2,0 g
10 % SDS-Lösung	-	5 ml
Bromphenolblau-Lsg.	-	1,25 ml

Der Probenauftragspuffer wurde zu je 475 µl in 1,5 ml PP-Reaktionsgefäßen aliquotiert und bis zur Benutzung bei -20 °C eingefroren. Kurz vor der Verwendung wurde der Puffer durch Zugabe von 25 µl DTT-Lösung (Endkonzentration: 160 mmol/l) vervollständigt.

TBS-Stammlösung pH 7,3		
Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage/Volumen
Tris	121,14	6,06 g
Natriumchlorid	58,44	40,0 g
Aqua dest.	18,02	ad 500,0 ml

Aus der TBS-Stammlösung (Trisgepufferte-Kochsalzlösung = Tris buffered saline) wurde durch 1:9 Verdünnung TBS-Lösung hergestellt. Die TBS-Lösung wiederum diente zur Herstellung von TBST (Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20[®] = Tris buffered saline with Tween 20) durch Zugabe von 200,0 µl Tween 20 in 100,0 ml TBS. Aus TBST konnte dann durch Lösen von 0,5 g Magermilchpulver in 100 ml TBST die Blockierungslösung hergestellt werden.

3.10.3 Durchführung der SDS-PAGE

Die zu untersuchenden Proteinlösung, der Protein Größenstandard und ein Aliquot Probenaufragspuffer (PAP) wurden zum Auftauen auf Eis gelagert. Zur Herstellung der Gele wurden zwei 25 ml Rundkolben mit einem 1,5 cm Rührfisch bestückt. Das Trenngel (Endkonzentration Acrylamid 7,5 %) wurde wie folgt hergestellt: 3,750 ml Acrylamid-Lösung (30 % (m/V)), 5,625 ml Tris-HCl pH 8,8 und 5,365 ml Wasser wurden in einem Rundkolben vorgelegt und gut verrührt. Beim Entgasen durch Anlegen eines Unterdruckes von 50 mbar für 15 min wurde der Sauerstoff aus der Lösung entfernt, der durch Abfangen der radikalischen Zwischenprodukte die Polymerisation des Acrylamids verhindern würde. Im Anschluss wurden zügig 150 µl SDS, 12 µl TEMED und 100 µl der APS-Lösung zupipettiert und vorsichtig gerührt, um Schaumbildung zu vermeiden.

Nun erfolgte die Befüllung der Gießvorrichtung mit der Trenngellösung unter Zuhilfenahme einer Einmalpipette, wegen der Toxizität des Acrylamids und um Kontamination anderer Geräte zu vermeiden. Um eine möglichst gerade Abschlussfläche zu erhalten wurde die Trenngelmischung in der Gießvorrichtung noch mit Wasser überschichtet.

Zur Herstellung des Sammelgels (Endkonzentration Acrylamid 5 % (m/V)) wurden 833 µl Acrylamid-Lösung, 625 µl Tris-HCl und 3,465 ml Aqua dest. in den anderen Rundkolben pipettiert und wiederum für mindestens 15 min bei 50 mbar entgast. Nach Ablauf der Polymerisationszeit für das Trenngel wurden die restlichen Bestandteile, 50 µl SDS-Lösung, 5 µl TEMED und 20,8 µl APS-Lösung, zum Sammelgelansatz zugegeben und so die Polymerisation

gestartet. Vom fertigen Trenngel wurde vorsichtig das überschichtete Wasser abgeschüttet. Die Gießvorrichtung wurde dann mit dem Sammelgelansatz vollständig aufgefüllt und abschließend die Schablone für die Probestaschen so eingesetzt, dass keine Lufteinschlüsse vorhanden waren. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 30 min hatte das Gel eine genügend hohe Festigkeit und der Schablonenkamm konnte entfernt werden.

Das Gel wurde anschließend aus der Gießvorrichtung entfernt und in die Gelkammer eingesetzt. Der Elektrophoresepuffer wurde aus Elektrophoresepufferstammlösung durch 1:9 Verdünnung mit Wasser in einem Endvolumen von 1000 ml frisch hergestellt, die Elektrophoresekammer damit befüllt und die Probestasche mit dem Puffer gespült.

Die während der Membranpräparation (vgl. Kap. 3.8) erhaltenen Proteinproben wurden so verdünnt, dass sich ein Gesamtproteingehalt von 2 µg bzw. 4 µg pro Bahn ergab. Anschließend wurden sowohl der Proteinstandard als auch die Proben 1:1 mit PAP gemischt. Die Disulfidbrücken der Proteine wurden durch Inkubation der Proben im Thermoblock für 30 min bei 37 °C zu den freien Thiolen reduziert.

Die Proben wurden nun einzeln in die Taschen des Gels pipettiert und die Elektrophorese bei den in Tabelle 12 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 12: Einstellungen der Elektrophorese-Kammer für die SDS-PAGE

Spannung:	200 V
Zeit:	ca. 40 min

Die Dauer von 40 min konnte eventuell über- oder unterschritten werden, die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblaubande das Ende des Gels erreicht hatte.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Apparatur entfernt, das Sammelgel vorsichtig abgetrennt und verworfen. Um spezifische Proteine anzufärben wurde mit dem Trenngel ein Western-Blot durchgeführt.

3.10.4 Durchführung des Western Blots

Ein Stück PVDF-Membran wurde auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten, 20 s mit Methanol benetzt und bis zur Verwendung in Transferpuffer geschwenkt. Zunächst wurde der Blottingbehälter mit einem Kühllakku bestückt und der Tank bis zur Hälfte mit Transferpuffer

gefüllt. Zum Rühren wurde ein Rührfisch (2 cm) in den Tank gegeben und dieser auf einem Magnetrührer platziert. Das Trenngel wurde im Anschluss für 5 min im Transferpuffer equilibriert. Das Gel und die Membran wurden nun den Herstellerangaben entsprechend in die Block-Cassette eingesetzt, dabei wurde in einer Entwicklerschale gearbeitet, sodass alle Bestandteile immer mit Transferpuffer bedeckt waren. Eventuell eingeschlossene Luftblasen wurden unter Verwendung eines Glasstabs vorsichtig, durch leichten Druck entfernt. Anschließend wurde die Cassette in den Blotting-Tank überführt und fehlender Transferpuffer bis zur maximalen Füllhöhe zugegeben. Die Apparatur wurde angeschlossen und mit in Tabelle 13 gezeigten Einstellungen der Western Blot gestartet.

Tabelle 13: Einstellungen der Elektrophoresekammer für den Western Blot

Spannung:	<i>100 V</i>
Stromstärke:	<i>350 mA</i>
Zeit:	<i>60 min</i>

Nach Beendigung des Blots wurde die PVDF-Membran aus der Apparatur entnommen und die Antigen-Antikörperreaktion durchgeführt. Alle Reaktionen wurden auf dem Horizontalschüttler, bei Raumtemperatur durchgeführt und die Membran in verschiedenen Lösungen inkubiert. In einem geeigneten Gefäß wurden zunächst 50 ml Blockierungslösung vorgelegt. Durch Inkubation der Membran mit dem Milchprotein für 1 h wurde die Membranoberfläche mit Proteinen abgesättigt und die unspezifische Antikörperbindung auf ein Minimum reduziert. Überschüssige Blockierungslösung wurde durch dreimaliges Waschen für 10 min in TBST abgespült, hierbei wurde die TBST-Lösung bei jedem Schritt erneuert und die alte Lösung verworfen. Die Bindung des Antikörpers erfolgte während einer 1 stündigen Inkubation der Membran in 10 ml Antikörperlösung bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde der Blot in der Antikörperlösung über Nacht (mindestens 8 Stunden) im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Bei allen Antikörpern handelt es sich um monoklonale Antikörper, die mit Hilfe von Mäusen hergestellt wurden. Ein Problem dabei ist, dass sich einige Antikörper gegen hochkonservierte Regionen der Proteine richten und es zur Detektion der entsprechenden Proteine aus anderen Spezies (z.B. Hunde P-gp) kommen kann. Aus der Literatur ist dies z.B. für den Antikörper C219 bekannt [93].

Tabelle 14: Liste der verwendeten Antikörper. Alle Antikörper wurden bei Chemicon® International erworben.

Antikörper	Bez.	Verdünnung	keine Kreuzreaktion	Epitope
MRP1	QRCL-1	1 : 500	MDR1, MDR3, MRP2-6	Intern: AS 918-924
MRP2	M ₂ I-4	1 : 50	MDR1, MRP1, MRP3, MRP5	Intern: AS 215-310
P-gp	C219	1 : 640	MRP1, MRP2, MRP3	Intern

Die Antikörperlösungen waren aufgrund des Azidzusatzes gegen mikrobiologische Kontamination geschützt und konnten nach Gebrauch mehrmals (bis zu 6 Monate bei einer Lagerung bei -20 °C) wiederverwendet werden.

Am nächsten Tag wurde die überschüssige Antikörperlösung in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt und wie oben beschrieben zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Membran wurde dann dreimal mit 40 ml frisch hergestelltem TBST-Puffer für je 10 min auf dem Horizontalschüttler gespült und geschüttelt, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. In der Zwischenzeit wurden 20 ml einer Lösung aus 5 % (m/V) Magermilchpulver in TBST-Puffer hergestellt und im Anschluss im Verhältnis 20.000:1 mit dem sekundären Antikörper gemischt. Eine Membran wurde mit 10 ml der sekundären Antikörperlösung in TBST benetzt und für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Antikörperlösung wurde im Anschluss verworfen und die Membran noch zweimal in 40 ml TBST-Puffer für je 10 min gespült bzw. nach dem zweiten Waschschrift bis zur weiteren Detektion in TBST geschwenkt.

Der sekundäre Antikörper (anti-mouse) ist gegen das F_C-Fragment des primären Antikörpers gerichtet. Zusätzlich ist an den Antikörper das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welches der weiteren Detektion dient. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL-Reagenz (engl.: Enhanced Chemiluminescence), das nach Herstellerangaben verdünnt und zubereitet wurde. Der TBST-Puffer wurde von der Membran entfernt und 2 ml der frisch hergestellten ECL-Lösung vorsichtig an den Rand der Membran pipettiert. Durch vorsichtiges Schwenken konnte sich die Lösung gleichmäßig auf der Membran verteilen, und es folgte eine kurze Inkubationsphase von 2 min bei Raumtemperatur. Die Peroxidase konnte in dieser Zeit das in der ECL-Lösung enthaltene Substrat zu einem Produkt umsetzen, dessen Chemilumineszenz dann mit der Geldokumentationseinheit detektiert und festgehalten werden konnte.

3.11 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluoresceindiacetat (CDFD) Uptake Assay

3.11.1 Funktionsweise des CDFD-Assays

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an den Efflux-Assay von Lauopeze et al. [94]. 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluoresceindiacetat (CDFD) ist eine nicht fluoreszierende Vorstufe des 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluoresceins (CDF) und eine Mischung aus 5- und 6- Carboxy-2',7'-dichlorofluoresceindiacetat. Durch intrazelluläre Esterasen wird CDFD zum fluoreszierenden CDF hydrolysiert.

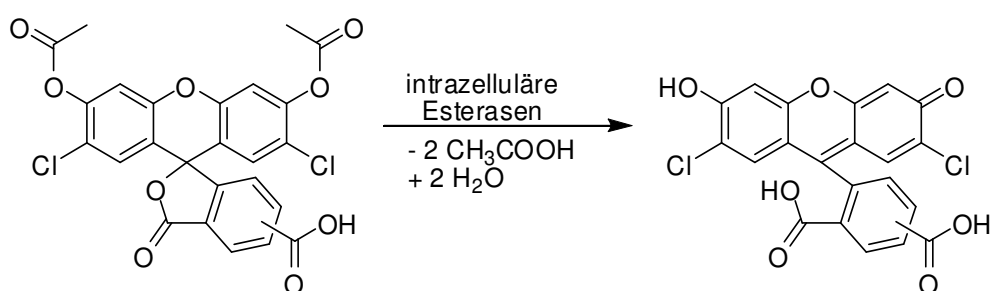


Abbildung 7: Reaktion von 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluoresceindiacetat zum 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein, dem fluoreszierenden Agens.

In Abbildung 7 ist die Reaktion des CDFD zum CDF schematisch dargestellt. Sowohl CDFD als auch CDF sind Substrate des MRP2 und werden durch das Protein aktiv aus der Zelle in das umgebende Medium transportiert; wobei eine Affinität für das Anion vorliegt [94]. CDF selbst kann die Zelle auf Grund der Ladung nur in sehr geringem Maße verlassen, sodass es intra_zellulär zur Akkumulation kommt. Im Gegensatz zum Calcein-AM-Assay (vergl. Kap. 3.13) kann die Fluoreszenz des extrazellulären CDF nicht durch Zugabe von Cobalt(II)-Ionen gequencht werden, sodass nicht im Microplate-Reader (Fluostar oder Polarstar) gemessen werden konnte.

3.11.2 Durchführung des CDFD-Assays im FACS®-Röhrchen

Für den Assay wurden keine speziellen Puffer verwendet, außer dem schon in Kap. 3 beschriebenen Krebs-HEPES-Puffer (KHP). Lediglich die CDFD-Lösung musste aus einer 1 mmol/l Stammlösung in DMSO durch Verdünnen in KHP hergestellt werden. Hierzu wurden 5 µl der Stammlösung in 5 ml KHP verdünnt und mit Hilfe eines Vortexers gut vermischt. Die ver-

schiedenen Zelllinien (MDCKII, MDCKII MRP2, 2008 und 2008 MRP2) wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben von den T175-Gewebekulturflaschen abgelöst. Nach dem Zählen wurden die Zellen dreimal mit je 5 ml KHP gewaschen, wobei jeweils ein Zentrifugationsschritt bei 266 g und 4 °C und Absaugen des Mediums vor Ersetzen des Mediums bzw. des KHPs vorausgingen. Die Zelldichte wurde nach der letzten Zentrifugation so mit der Pufferlösung eingestellt, dass eine Suspension mit einer Millionen Zellen pro Milliliter entstand. Von dieser wurden je 800 µl auf die FACS®-Röhrchen verteilt. Nach Zugabe von 100 µl eines Modulators bzw. KHP (Nullwert), folgte eine Inkubationsphase von 15 min bei 37 °C im Wasserbad. Im Anschluss daran wurden 100 µl der CDFD-Lösung zugesetzt und sofort mit der ersten Messung begonnen (Endkonzentration 0,5 oder 1 µmol/l). Nach definierten Zeitpunkten wurde eine Probe im FACS®-Calibur vermessen. Die Einstellungen für das Gerät sind Tabelle 15 zu entnehmen.

Über den gesamten Messzeitraum wurden die Zellen im auf 37 °C temperierten Wasserbad leicht geschüttelt, sodass sich die Zellen nicht anheften konnten und das Temperaturoptimum für das MRP-Protein eingehalten wurde. In der Dissertation von H. Müller konnte der Einfluss der Temperatur auf die Transportgeschwindigkeit der ABC-Transporter nachgewiesen werden. [95].

Tabelle 15: Einstellungen des FACS®-Calibur für den CDFD-Assay im Röhrchen

Forward Scatter	<i>E00</i>	<i>Linear</i>
Side Scatter:	<i>350</i>	<i>Linear</i>
Fluoreszenzkanal 1:	<i>600</i>	<i>Logarithmisch</i>
Modus:		<i>Röhrchen</i>

3.11.3 Durchführung des Microplate-CDFD-Assays

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben wurden die Zellen (MDCKII, MDCKII MRP2) bei 80-90 % Konfluenz mit Hilfe von Trypsin von den T175-Gewebekulturschalen abgelöst. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit Hilfe des Casy®-Model TT -Zellzählers gezählt und 10 Millionen Zellen in ein PP-Röhrchen überführt und nochmal abzentrifugiert (266 g, 4 °C). Der Überstand wurde entfernt und durch 5 ml KHP ersetzt. Nach Resuspension folgten drei weitere Zentrifugationsschritte unter gleichen Bedingungen, um alle Reste des Nährmediums zu entfernen. Dies war notwendig, da im Nährmedium zum einen der absorbierende Farbstoff

Phenolrot, als auch Esterasen enthalten sind, die CDFD schon vor Eintritt in die Zelle hydrolysieren würden.

In eine 96-Well Platte wurden dann 160 µl der Zellsuspension in jede Vertiefung einpipettiert. Danach wurden je 20 µl der zu untersuchenden Modulatoren in die Wells pipettiert. Damit sich ein Gleichgewicht einstellen konnte wurde eine kurze Vorinkubation von 15 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt vorgenommen. Erst im Anschluss daran wurden je Well 20 µl des Farbstoffs zupipettiert, was zu einer Endkonzentration von 0,5 µmol/l CDFD pro Well führte. Danach wurde die Platte abgedeckt und im Inkubator für 2 h Stunden bei oben genannten Bedingungen inkubiert, sodass sich ein Gleichgewicht zwischen Influx und Efflux einstellen konnte. Danach wurde die Platte bei den in Tabelle 16 aufgeführten Einstellungen vermessen:

Tabelle 16: Einstellungen des FACS®-Calibur für den Microplate CDFD-Assay

Forward Scatter	<i>E00</i>	<i>Linear</i>
Side Scatter:	<i>350</i>	<i>Linear</i>
Fluoreszenzkanal 1:	<i>600</i>	<i>Logarithmisch</i>
Modus:		<i>MAS</i>

3.11.4 Funktionsweise der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messverfahren, bei dem einzelne Partikel in einem Flüssigkeitsstrom auf Fluoreszenz- und/oder Streulichtsignale untersucht werden können. Diese Partikel können auch Zellen oder Zellbestandteile darstellen. Im Wesentlichen besteht ein Durchflusszytometer aus drei Bestandteilen:

Einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System und einem Signal verarbeitenden System. Das Flüssigkeitssystem ist das Medium in dem die Zellen suspendiert und durch die Messkammer mit dem optischen System geführt werden. Es führt von der Zuleitung über die Messkammer bis hin zum Abfallbehälter (Hüllstrom). Eine zweite Leitung führt die Proben aus dem Probenröhrchen bzw. der Messplatte dem Hüllstrom zu und mit diesem in die Messkammer. Bevor Hüllstrom und Probenstrom sich vereinigen wird letzterer verengt und auf bis zu 7 m/s beschleunigt. Dieser Vorgang wird auch als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet und

sorgt dafür, dass die zu vermessenden Zellen vereinzelt und perlenschnurartig an der Messvorrichtung vorbeigeführt werden.

Am Messpunkt trifft ein Lichtstrahl mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm auf die vereinzelt Zelle.

Das optische System wiederum ist aus einer Anregungs- und einer Detektionseinheit aufgebaut. Die Anregungseinheit besteht aus einem Argonlaser, dessen Strahl zu einem horizontal elliptischen Durchmesser von 20 x 60 µm mit ausreichender Signalintensität und Auflösung verformt und gebündelt wird. Die Detektionseinheit erfasst den Forward Angle Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) und die Fluoreszenz.

FSC bedeutet so viel wie Vorwärtsstreulicht, das axial zum anregenden Laserstrahl detektiert wird. Das Vorwärtsstreulicht ist proportional zur Zelloberfläche.

Der SSC misst das Streulicht, das im Winkel von 90° austritt. Das Seitwärtsstreulicht resultiert aus Reflexion und Lichtbrechung und ist proportional zur Granularität bzw. Komplexität der Zelle.

Die Fluoreszenz schließlich wird ähnlich wie der SSC im Winkel zum anregenden Laserstrahl gemessen. Sie dient als Messgröße zur Identifizierung der gewünschten Eigenschaften, in diesem Fall der Transportaktivität des Resistenzproteins. Je nach emittierter Wellenlänge kann das emittierte Licht in drei unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen (FL₁, FL₂ und FL₃) detektiert werden, die sich in den Wellenlängenbereichen unterscheiden.

Das signalverarbeitende System konvertiert optische Signale in elektrische. Als Photodetektoren kommen hierbei Photodioden (FSC) und Photoröhren (FSC und Fluoreszenz) zum Einsatz [96]. Der Vorteil der Durchflusszytometrie besteht darin, dass jede Zelle einzeln vermessen werden kann, ohne das im Medium vorhandene, fluoreszierende Substanzen stören.

3.12 Daunorubicin-Efflux-Assay

3.12.1 Grundlagen des Daunorubicin-Efflux-Assays

Daunorubicin ist ein Substrat vieler ABC-Transporter, die für Multidrug Resistenz verantwortlich gemacht werden, darunter P-gp, MRP1 und MRP2 [97, 98]. Es besitzt fluoreszierende Eigenschaften und interkaliert in die DNA, was zur Auslöschung der Fluoreszenz führt [99]. Die DNA ist aufgrund ihrer Größe und Polarität nicht in der Lage passiv durch die Zellmembran zu diffundieren. Inkubiert man nun Zellen mit und ohne ABC-Transporter mit Dauno-

Daunorubicin, so diffundiert dieses durch die Zellmembran und akkumuliert innerhalb der Zelle. Ist ein oben genannter Transporter vorhanden, wird es aktiv aus der Zelle hinaus transportiert, sodass deutlich weniger Daunorubicin innerhalb der Zelle vorhanden ist. Durch Zugabe eines Inhibitors für den entsprechenden Transporter wird konzentrationsabhängig der Gehalt an Daunorubicin in der Zelle erhöht, da dieser mit Daunorubicin um den Efflux konkurriert. Nach einiger Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Uptake und Efflux ein.

Bei der Durchführung mit Zellen kann nach Einstellung des Gleichgewichts extrazellulär DNA zugeführt werden und das im Medium befindliche Daunorubicin durch Interkalation in die DNA aus dem Influx/Efflux-Gleichgewicht entfernt werden. Eine Abnahme der Daunorubicin-Fluoreszenz ist zu beobachten. Bei unterschiedlicher Modulatorkonzentration sollte dann eine geringere Abnahme der Fluoreszenz zu sehen sein, bis hin zur Anpassung an den entsprechenden Wildtyp ohne das Transportprotein.

3.12.2 Durchführung des Daunorubicin-Efflux Assays

Die Zellen (A2780, A2780 Adr, MDCKII, MDCKII MRP2) wurden wie oben beschrieben von den Gewebekulturflaschen abgelöst und dreimal mit KHP gewaschen, um Reste des Nährmediums zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend mittels des Casy[®] ModelTT gezählt und so verdünnt, dass eine Zelldichte von 1 Million Zellen pro ml entstand. Je Well wurden dann 160 µl dieser Suspension in eine 96-Wellplatte mit Hilfe einer Multikanalpipette pipettiert. Im Anschluss wurde bei den MDCKII-Zelllinien 10 µl einer 100 µmol/l XR9577 Lösung zugegeben, damit das in den Zellen enthaltene P-gp blockiert und die Messung durch die Anwesenheit dieses Transporters nicht verfälscht wurde. Wurde der Versuch mit der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 bzw. A2780 Adr durchgeführt, wurden 170 µl der entsprechenden Zellsuspension verwendet. Eine Inhibition von P-gp durch XR9577 war nicht erwünscht, weshalb die Lösung nicht zugesetzt wurde.

Im Folgenden wurden die entsprechenden Modulatoren mit einem Volumen von 20 µl in die Wells pipettiert. Für den Nullwert wurde das entsprechende Lösungsmittel des Modulators, in der Regel KHP, gegebenenfalls Aqua dest., in die Wells gegeben. In Abbildung 9 ist das verwendete Pipettierschema, das identisch ist mit dem für den Calcein-AM-Assay, dargestellt. Nachdem die Modulatoren zugesetzt worden waren, folgte eine kurze Vorinkubationsphase von 15 min im Brutschrank bei 37 °C. Danach wurden 10 µl einer 10 µmol/l Daunorubicin

Lösung mittels Multikanalpipette zugesetzt, sodass eine Endkonzentration von 0,5 µmol/l pro Well entstand. Bis zur Einstellung des Steady-States (Gleichgewichtszustands) wurde die Mikrotiterplatte dann für weitere 2 h im Inkubator bei 5 % CO₂ und 37 °C bebrütet.

Kurz vor der Messung wurden dann pro Well 10 µl einer 1 mg/l DNA-Suspension zugesetzt und die Platte unmittelbar im Anschluss mit den in Tabelle 17 beschriebenen Einstellungen im Microplatereader vermessen:

Tabelle 17: Testparameter für den Daunorubicin-Efflux Assays mittels Microplatereader

Anzahl der Zyklen:	30
Anzahl der Lichtblitze:	10
Intervallzeit zwischen den Reihen:	0,5
Vermessung der Mikrotiterplatte:	<i>Horizontal</i>
Required Value:	50 %
Gain (485/520):	-/40
Scan-Modus:	<i>Plate</i>

3.12.3 Datenanalyse des Daunorubicin-Efflux Assays

Zur Auswertung des Daunorubicin-Efflux Assays wurden zuerst wieder die Nullwerte ohne Zellen von den erhaltenen Werten mit Zellen abgezogen. Aus den erhaltenen Kurven wurde der hintere lineare Teil manuell ausgewählt und mittels linearer Regression gefittet. Zum Erhalt einer Dosis-Wirkungskurve wurden dann die erhaltenen Steigungen gegen die logarithmierten Konzentrationen des Modulators aufgetragen (siehe auch Kapitel 3.13.5).

3.13 Calcein-AM-Assay

3.13.1 Grundlagen

Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM) ist eine nicht fluoreszierende Vorstufe des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein. Dieser wird durch unspezifische Esterasen intrazellulär aus dem Calcein-AM gebildet. Calcein-AM ist sehr lipophil und kann die Zellmembran der Krebszellen nahezu ungehindert überwinden. Auf der anderen Seite besitzt das gebildete Calcein-Anion durch seine entstehenden Carbonsäurefunktionen eine vierfach negative Ladung, ist dadurch

sehr viel hydrophiler und kann die Zellmembran so nur noch durch aktiven Transport überwinden. Calcein-AM ist ein Substrat sowohl von P-gp als auch von MRP1 und MRP2 [100, 101], während das Calcein-Anion nur für MRP1 und MRP2 ein, wenn auch deutlich schlechteres, Substrat darstellt [102]. Um die mögliche extrazelluläre Fluoreszenz zu unterdrücken wurden Cobalt(II)-Ionen verwendet, die einen quenchenden Effekt auf das Calcein-Anion ausüben und aufgrund ihrer Eigenladung nicht passiv in die Zelle diffundieren können.

Calcein-AM kann also von allen untersuchten Transportproteinen als Substrat erkannt und aus der Zelle hinaus geschleust werden, sodass im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp deutlich weniger Calcein-AM in die Zelle gelangt und somit auch weniger Calcein-AM in das fluoreszierende Anion umgewandelt werden kann. Gibt man nun einen Modulator des entsprechenden Transportproteins hinzu, kommt es zu einer Konkurrenz um die Bindungsstelle am Transportprotein. Dadurch kann mehr Calcein-AM in die Zelle gelangen und es kommt zu einem von der Modulatorkonzentration abhängigen Fluoreszenzanstieg in der Zelle.

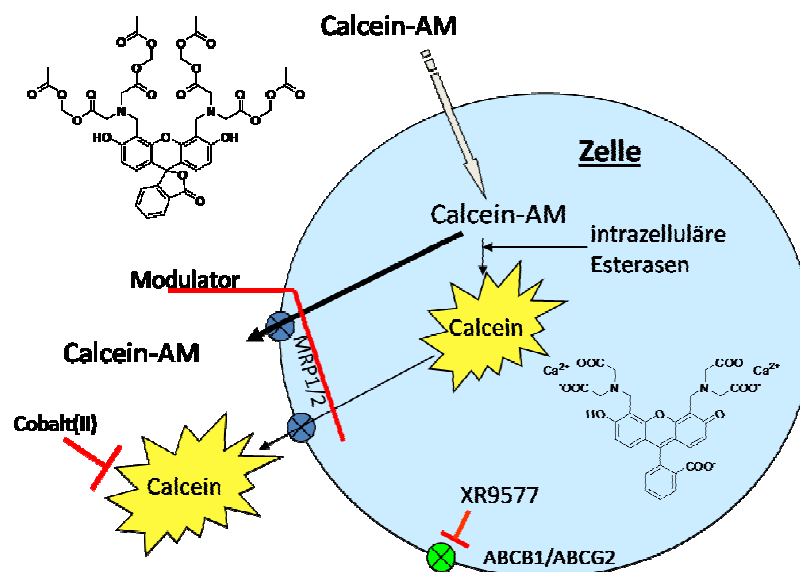


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Calcein-AM Akkumulations-Assays für MRP1 und MRP2.

Die Bildung des Calcein-Anions ist hierbei abhängig von mehreren Faktoren. Unter Anderem wird sie von der Diffusionsgeschwindigkeit des Esters durch die Zellmembran und von der Hydrolyse-Geschwindigkeit der Esterasen, die wie die meisten Enzyme einer Michaelis-Menten Kinetik folgen, beeinflusst. Während der Messung bleibt die Konzentration des Modulators konstant, während die Calcein-AM Konzentration im Laufe der Messung sinkt. Die Kinetik folgt also einer Reaktionskinetik erster Ordnung. Zum Beginn der Messung ist ein so

großer Überschuss des Esters vorhanden, dass eine Kinetik pseudonullter Ordnung angenommen werden kann und zu Beginn der Messung eine lineare Kinetik vorliegt. Das Calcein-Anion ist ein so schlechtes Substrat von MRP1 und MRP2, dass auch bei diesen Zelllinien zu Beginn der Messung die gleiche Kinetik angenommen werden kann [103].

3.13.2 Calcein-AM-Assay für MRP1 und MRP2

Die verschiedenen Zelllinien (MDCKII MRP1, MDCKII MRP2, MDCKII, 2008 MRP1, 2008 WT) wurden von der Gewebekulturflasche abgelöst und zentrifugiert, danach wurde die Zellzahl wie in Kap. 3.7 beschrieben bestimmt. Für eine 96er-Mikrotiterplatte wurden 1,5 Millionen Zellen pro Zelllinie verwendet. Das entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde aus dem 50 ml PP-Röhrchen in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zentrifugation (10.000 rpm, Shortspin) wurde das Nährmedium entfernt und durch 1 ml KHP ersetzt, ohne das Zellpellet zu beschädigen. Dann folgten drei Waschschrte in je 1 ml KHP (10.000 rpm, Shortspin). Das Pellet wurde jeweils mit 1 ml KHP resuspendiert und dann wieder zentrifugiert. Nach den Waschschrten wurde das Zellpellet durch Auf- und Abpipettieren in 1 ml KHP resuspendiert und vorsichtig in ein Falcon mit 4 ml KHP gegeben. Nach Homogenisierung mit Hilfe des Vortexers[®] wurden jeweils 70 µl dieser Zellsuspension in eine 96er-Mikrotiterplatte nach dem in Abbildung 9 aufgeführten Schema überführt. Die Reihen 2, 3, 5, 6, sowie 8, 9, 11 und 12 der Platte wurden mit der Zellsuspension versetzt, während in die übrigen Reihen die gleiche Menge Puffer gefüllt wurde. Nun wurden 10 µl einer 50 µmol/l XR9577-Lösung zur Blockierung von P-gp und BCRP mit Hilfe einer Multikanalpipette in alle Wells gefüllt. Es folgte eine 10 minütige Vorinkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid.

Im Anschluss wurden die Modulatoren in einem Volumen von 10 µl zupipettiert, wobei jede Konzentration im Triplet pipettiert wurde. Das heißt 10 µl wurden immer in eine Vertiefung, in der nur Puffer vorgelegt war und zwei in Vertiefungen, die Zellsuspension enthielten, gefüllt. Zum Schluss wurden zu jedem Well noch 10 µl einer 10 µmol/l Cobalt(II)-sulfat-Lösung in KHP zupipettiert, sodass eine Endkonzentration von 1 µmol/l Cobaltionen pro Well resultierte.

Im Anschluss erfolgte eine weitere Inkubationsphase von 30 min unter oben genannten Bedingungen, sodass sich ein Gleichgewicht einstellen konnte.

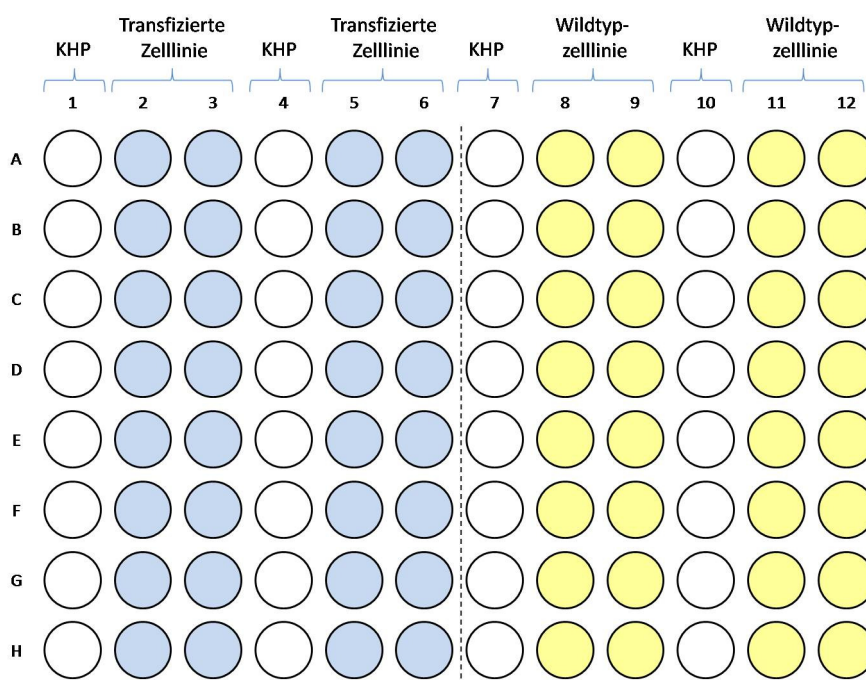


Abbildung 9: Pipettierschema eines standardmäßigen Calcein-AM-Akkumulations-Assays. Je nach Versuchsanordnung konnte die Wildtypzelllinien durch die transfizierte Zelllinie ersetzt werden. KHP wurde anstatt der Zellsuspension in jede dritte Spalte einpipettiert, um die Eigenfluoreszenz der Substanzen zu überprüfen.

Kurz vor Beendigung der Inkubation wurde die Calcein-AM-Verdünnung aus einer 1 mmol/l Stammlösung durch verdünnen von 5 µl der Stammlösung in 4 ml KHP hergestellt. Nach gründlichem Vortexen der so entstandenen Calcein-AM-Lösung wurden die Platten aus dem Brutschrank entnommen und jedes Well mit 33 µl der Calcein-AM-Verdünnung versehen. Daraufhin wurden die Mikrotiterplatten in die Fluoreszenzreader gestellt und bei in Tabelle 18 beschriebenen Einstellungen vermessen.

Tabelle 18: Einstellungen der Microplatereader am Beispiel des POLARstar®

Anzahl der Zyklen:	20
Anzahl der Lichtblitze:	10 s^{-1}
Intervallzeit zwischen den Reihen:	1 s
Vermessung der Mikrotiterplatte:	<i>Horizontal</i>
Required Value:	20 %
Gain (485/520):	-/36
Scan-Modus:	<i>Plate</i>

3.13.3 Calcein-AM-Assay für P-gp

Die Durchführung der Inhibitionsmessung für P-gp erfolgte ähnlich der in Kapitel 3.13.1 beschriebenen Aktivitätsbestimmung für MRP1 und MRP2. Da P-gp aber nicht in der Lage ist das negativ geladene Calcein zu transportieren, ist es nicht nötig Cobaltionen zum Quenchen von extrazellulärem Calcein einzusetzen. Des Weiteren entfielen die Zugabe und die Vorinkubation mit XR9577, da die Aktivität von P-gp gemessen und nicht unterdrückt werden sollte. Das Volumen für die Zellsuspension wurde somit auf 90 µl pro Well und damit die Zellzahl auf 27.000 Zellen/Well erhöht. Ansonsten entsprachen die Durchführung und die Messeinstellungen denen für die Calcein-AM-Assays für MRP1 und MRP2.

3.13.4 Kombinationsassays mit zwei Modulatoren

Prinzipiell gleicht die Durchführung des Kombinationsassays der in Kap. 3.13.2 beschriebenen für MRP1 und MRP2. Jedoch wurden Cobalt(II)-ionen und XR9577-Lösung nicht getrennt, sondern zusammen hergestellt, sodass nur 10 µl einer Kombinationslösung aus 10 µmol/l Cobaltsulfat und 50 µmol/l XR9577 verwendet wurde. Der Vorteil lag darin, dass so die Zellzahl gleich bleiben konnte, während die Möglichkeit bestand noch einen weiteren Modulator zuzusetzen. Des Weiteren entfielen die in Abbildung 9 gezeigten Reihen ohne Zellen, sodass mehr Konzentrationen auf einer Platte aufgetragen werden konnten.

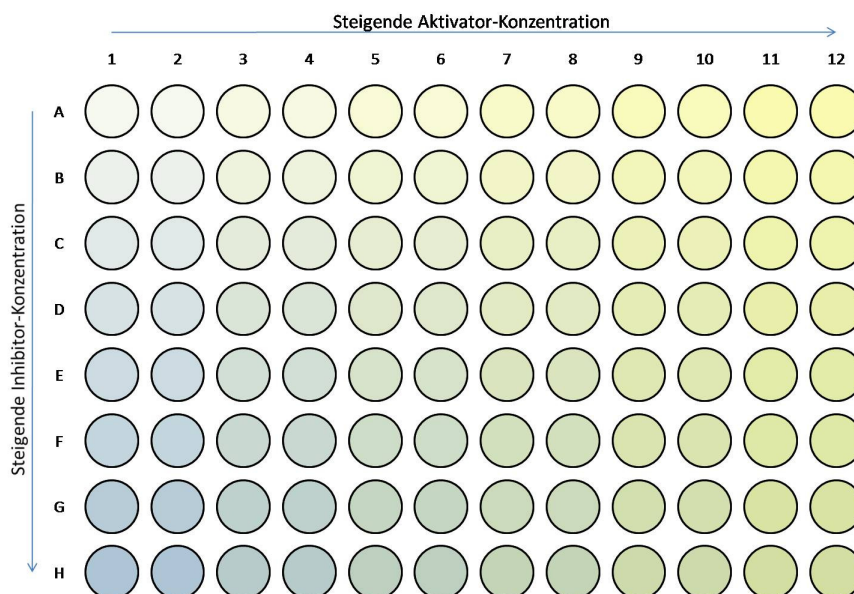


Abbildung 10: Pipettierschema für einen Kombinationsassay. Während von links nach rechts die i. d. Regel die Aktivator-Konzentration (gelb) steigt, steigt die Inhibitor-Konzentration (blau) von oben nach unten.

Vorher musste jedoch auf eventuelle Eigenfluoreszenz des Modulators geprüft werden, da die Eigenfluoreszenz nicht mehr abgezogen werden konnte. In Abbildung 10 ist das verwendete Pipettierschema dargestellt. Die verwendeten Einstellungen für die Fluoreszenzmessgeräte gleichen denen für den oben beschriebenen Standardassay (Tabelle 18).

3.13.5 Datenanalyse der Calcein-AM-Assays

Die Datenanalyse für die Calcein-AM-Assays erfolgte mit Hilfe von Microsoft® Excel. Ein Auswertungssheet wurde erstellt, welches die im Puffer ermittelten Fluoreszenzwerte von den entsprechenden Daten mit Zellen subtrahiert und die Steigung der resultierenden Fluoreszenz-Zeitkurve berechnet. Die ermittelte Steigung (später als Response bezeichnet) wurde auf der Ordinate gegen die logarithmische Modulatorkonzentration auf der Abszisse aufgetragen. Mit Hilfe von Gleichung 1 und einer nichtlinearen Regression wurde eine sigmoidale Kurve erzeugt.

Gleichung 1

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{(\log EC_{50} - \log x) * n_H}}$$

Bei der Gleichung handelt es sich um die vier-Parameter-logistische-Gleichung. Dabei beschreibt y den Fluoreszenzanstieg pro Zeiteinheit, welcher abhängig von der eingesetzten Konzentration des Modulators ($\log x$) ist. Der minimale Fluoreszenzanstieg wird durch „ \min “ charakterisiert, während „ \max “ den maximal erreichbaren darstellt. Aus der sigmoidalen Kurve wurde dann die EC_{50} (bzw. IC_{50}) ermittelt. Sie beschreibt die Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt auslöst. Ist dieser Effekt eine Inhibition, spricht man von IC_{50} (Inhibitory Concentration). In der sigmoidalen Kurve entsprechen diese Werte dem Wendepunkt der Kurve.

Der Hillkoeffizient n_H beschreibt die Steilheit der Kurve. Eine von $n_H = 1$ abweichende Kurve gibt erste Hinweise auf einen nicht rein kompetitiven Mechanismus. Die Auswertung mit einem variablen Hillkoeffizienten erfolgte nur, wenn die Entscheidung mit einem F-Test (siehe Kapitel 3.17.1) abgesichert wurde. Ansonsten wurde die drei-Parameter-logistische-Gleichung verwendet, in der von $n_H = 1$ ausgegangen wird.

3.14 MTT-Assay

3.14.1 Funktionsweise des MTT-Assays

Der MTT-Assay ist ein Zellüberlebenstest, mit dem man die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber einer oder mehrerer Substanzen überprüfen kann. Das Prinzip des Assays beruht darauf, dass man die Aktivität der mitochondrialen Hydrogenasen bestimmt, die nur in lebenden Zellen funktionsfähig sind. Hierbei wird das gelbe, wasserlösliche 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT) enzymatisch zum violetten, wasserunlöslichen 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan reduziert, welches photometrisch detektiert werden kann (vergleiche Abbildung 11). Werden die Zellen durch die Testsubstanz geschädigt oder abgetötet, sinkt die Aktivität der Enzyme. Hierbei ist die Absorption proportional zur Zellvitalität [104, 105].

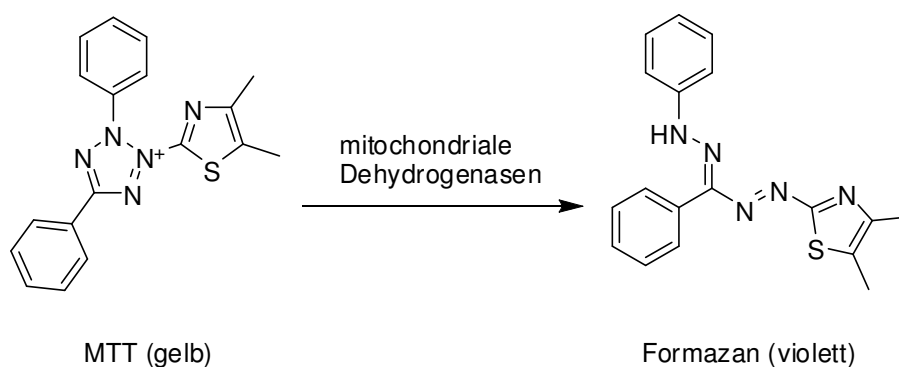


Abbildung 11: Reaktionsgleichung des MTT-Assays

3.14.2 Durchführung des MTT-Assays

Die verschiedenen Zelllinien (A2780, A2780 Adr; MDCKII, MDCKII MRP2) wurden wie in Kap 3.2 beschrieben bis zur fast vollständigen Konfluenz kultiviert und im Anschluss daran mit Hilfe von Trypsin/EDTA geerntet und bei 266 g und 4 °C zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit frischem Medium auf 10 ml aufgefüllt und resuspendiert. Im Anschluss daran wurde die Zellzahl (vergl. Kap. 3.7) bestimmt.

1,5 Millionen Zellen wurden auf 12,5 ml verdünnt, sodass eine Zellzahl von 120.000 Zellen/ml entstand. Mit Hilfe einer Multikanalpipette wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit 90 µl pro Well befüllt, was einer Zelldichte von ungefähr 10.800 Zellen pro Well entspricht.

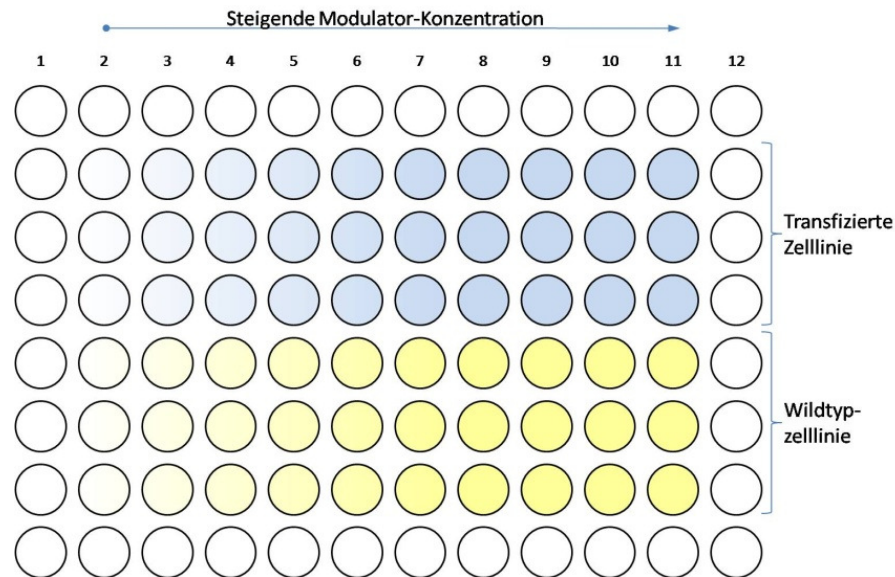


Abbildung 12: Pipettierschema für den MTT-Assay. Weiß unterlegte Wells wurden nur mit Medium gefüllt. Blau unterlegt sind Wells mit der transfizierten Zelllinie, gelb mit der Wildtypzelllinie.

Damit die Zellen sich anheften konnten, wurde die 96-Well-Mikrotiterplatten für mindestens 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach spätestens 12 h wurde mikroskopisch das Anheften der Zellen kontrolliert und im Anschluss daran die Zellen mit 10 µl der gewünschten zu untersuchenden Substanz versetzt. Es resultierte ein Endvolumen von 100 µl. Jede Konzentration wurde mindestens als Dreifachbestimmung aufgetragen. Als Nullwert diente das Lösungsmittel der Substanz. Die äußersten Reihen wurden nur mit 1 x KHP befüllt, da dort eine erhöhte Verdunstung stattfinden konnte. Diese Werte wurden auch nicht in die Messungen mit einbezogen. In Abbildung 12 ist schematisch der Aufbau einer Platte dargestellt. Die Platte wurde horizontal in der Mitte aufgeteilt. In einer Hälfte wurde der Wildtyp einer Zelllinie aufgetragen und in der anderen entsprechend die transfizierte bzw. resistent gezüchtete Zelllinie. Nach der Inkubationszeit von 72 h bei oben genannten Bedingungen im Brutschrank wurden die Zellen mit einer MTT-Lösung (100 mg MTT auf 20 ml PBS-Puffer, lichtgeschützte Lagerung) versetzt. Pro Well wurden 20 µl der Lösung mit einer Multikanalpipette zugesetzt. Im Anschluss daran folgte eine weitere Inkubationsphase von 60 – 90 min, in der die Reduktion des Farbstoffes in den Mitochondrien stattfand. Die erfolgreiche Umsetzung wurde unter dem Mikroskop anhand der Bildung der unlöslichen Kristalle kontrolliert und durch Zupipettieren von 150 µl eines Gemisches aus 2-Propanol und konzentrierter Salzsäure (2-Propanol : HCl = 1 : 0,033) mittels Multikanalpipette beendet. Die Mikrotiterplatte wurde

dann für mehrere Stunden im Kühlschrank bei 8 °C aufbewahrt, damit sich das entstandene Formazan vollständig lösen konnte.

Die Absorption wurde mit Hilfe des POLARstar® Microplatereaders bei zwei Wellenlängen gemessen: Bei 595 nm (Absorptionsmaximum des Formazans) und 690 nm (Hintergrundabsorption). Die Testparameter des POLARstars wurden wie in Tabelle 19 beschrieben festgelegt:

Tabelle 19: Testparameter für den MTT-Assay im POLARstar®

Anzahl der Zyklen:	1
Anzahl der Lichtblitze:	20 s ⁻¹
Intervallzeit zwischen den Reihen:	1,0 s
Vermessung der Mikrotiterplatte:	Horizontal
Required Value:	80 %
Gain (595 nm / 690 nm):	- / -
Scan-Modus:	Plate

3.14.3 Der MTT-Assay als Kombinationsassay mit zwei Substanzen

Neben der in Kapitel 3.14.2 beschriebenen Methode, eignet sich der Assay auch zur Bestimmung der Hemmwirkung von Zytostatika in Gegenwart eines Modulators. Hierbei erfolgt die Durchführung analog zur obigen Vorschrift; mit dem Unterschied, dass die Zellzahl auf 135.000 Zellen / ml eingestellt wurde. Pro Well wurden dann 80 µl einpipettiert, sodass eine Zelldichte von ebenfalls 10800 Zellen/Well resultierte. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 4 h und maximal 12 h, in der sich die Zellen anheften konnten, wurden 10 µl der Modulatoren in den gewünschten Konzentrationen zugegeben, wobei die steigenden Konzentrationen vertikal pipettiert wurden. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation wurden 10 µl der Zytostatika Lösung entsprechend horizontal hinzugefügt, sodass ein Endvolumen von 100 µl entstand. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 72 h erfolgte die Bearbeitung analog zu der in Kapitel 3.14.2 beschriebenen Vorschrift.

Hinweis: Diese Methode wurde nur im Rahmen eines Projektes zur Charakterisierung von 150E, einem Naturstoff, in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. König verwendet.

3.14.4 Datenanalyse des MTT-Assays

Von den ermittelten Absorptionswerten beim Maximum des Formazans bei der Wellenlänge 595 nm wurden die ermittelten Werte der Hintergrundabsorption bei 690 nm subtrahiert, um mögliche Störungen durch das im Nährmedium enthaltene Phenolrot und nicht umgesetztes MTT zu minimieren. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism 5.01. Dazu wurden die ermittelten Absorptionwerte gegen die logarithmierten Konzentrationen des zu untersuchenden Modulators oder Zytostatikums aufgetragen. Die so erhaltene sigmoide Kurve wurde mit Hilfe der Hillgleichung (vergl. Kap. 3.13.5) analysiert und der IC_{50} -Wert ermittelt. Der IC_{50} -Wert gibt den Wert an, bei der die Hälfte des maximalen Effekts, in diesem Fall des Absterbens, erreicht wird.

3.15 Cisplatin-Uptake

3.15.1 Grundlagen des Cisplatin-Uptakes

Cisplatin oder auch *cis*-Diammindichloroplatin(II) (CDDP) ist ein vierbindiger Komplex, der als Zentralatom ein zweifach positiv geladenes Platinion und als Liganden je zwei Chloridionen sowie zwei Ammoniak-Moleküle, die zueinander *cis*-ständig sind, besitzt. Cisplatin selber ist somit ungeladen und kann relativ ungehindert durch die Zellmembran diffundieren. Im Vergleich zum Inneren der Zelle herrscht im Medium ein hoher Chloridgehalt, sodass es intrazellulär zum Austausch der Chloridliganden durch Wassermoleküle kommt. Infolgedessen bekommt der Aquakomplex eine zweifach positive Ladung und ist nun nicht mehr in der Lage passiv aus der Zelle hinauszudiffundieren. MRP2 steht als GS-X-Pumpe im Verdacht Cisplatin als Glutathion-Komplex aus der Zelle hinauszuschleusen. Ist dies der Fall, sollte in den mit MRP2 transfizierten Zellen intrazellulär weniger Platin vorhanden sein als in den Wildtypzellen. Der Platingehalt der Zellen kann mit Hilfe der flammenlosen Atom-Absorptionsspektroskopie (AAS) ermittelt werden [106, 107].

3.15.2 Grundlagen der flammenlosen Atom-Absorptionsspektroskopie

Mit einem Atom-Absorptionsspektrometer werden in der Regel Lösungen von Metallsalzen verdampft und analysiert. Dies geschieht entweder in einem Brenner oder in einem Graphitrohr, das zum Glühen erhitzt wird (flammenlose AAS).

Die Atome werden mit einer Hohlkathodenlampe mit elementspezifischer Anregungswellenlänge bestrahlt; dazu ist die Strahlungsquelle mit dem gleichen Element ausgerüstet, wie das zu untersuchende Element. Die in der Atomisierungseinrichtung verdampften Atome werden mit dem Licht aus der Hohlkathodenlampe bestrahlt und es kommt zu einer konzentrationsabhängigen Lichtabsorption durch die Atome des entsprechenden Elements. Zur Messung wird im Monochromator eine für das Element möglichst spezifische Wellenlänge ausgewählt, um Verunreinigungen auszuschließen. Verglichen wird die Messung immer mit einem Referenzstrahl

3.15.3 Probenvorbereitung der Cisplatin-Uptake-Versuche

Die Zellen (MDCKII, MDCKII MRP2) wurden wie in Kap. 3.2 beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Zählung der Zellen mittels des Casy[®] Model TT, wurden 5×10^6 Zellen in eine mit 10 ml Nährmedium befüllte T25er Gewebekulturschale ausgesät. Über einen Zeitraum von ca. 12 - 16 h konnten sich die Krebszellen im Brutschrank bei 37 °C wieder an den Boden der Schalen anheften. Anschließend wurde das Anheften der Zellen unter dem Lichtmikroskop überprüft. Waren die Zellen vital wurde das überstehende Nährmedium abgesaugt und durch 4,75 ml neues ersetzt. Mit einer Pipette wurden dann 0,25 ml einer 2000 µmol/ml Cisplatinlösung zugegeben, sodass eine Endkonzentration von 100 µmol/l Cisplatin im Nährmedium entstand. Im Anschluss wurden die Zellen zur Inkubation in den Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ Sättigung bis zur Beendigung der Cisplatin Aufnahme nach definierten Zeitpunkten (0, 10, 30, 60 und 120 Minuten) kultiviert. Zu den Messzeitpunkten wurde das cisplatinhaltige Nährmedium abgesaugt, um eine weitere Aufnahme von Cisplatin zu verhindern. Im Anschluss daran wurden die Zellen zweimal mit eisgekühltem PBS-Puffer gewaschen, um eventuelle Reste des Nährmediums und des Cisplatins zu entfernen. Danach wurden je Schale 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugetropft. Nach ca. 5 min Einwirkzeit wurde das Trypsin durch Zugabe von 3 ml Nährmedium inaktiviert und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren abgelöst. Anschließend wurde die entstandene Zellsuspension in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation für 4 min bei 266 g und 4 °C sedimen-

tiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 1 ml PBS-Puffer durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert, gewaschen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Short-Spin (ca. 10 Sekunden bis 10400 g) in einer Zentrifuge wurde abermals der Überstand abgesaugt und durch 1 ml frischen, eisgekühlten Puffer ersetzt. Das Pellet wurde erneut resuspendiert und nach nochmaligen Short-Spin ein drittes Mal der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.15.4 Kalibrierung der AAS

Zur Herstellung der Cisplatin-Stammlösung (SL) wurden 15,4 mg Cisplatin in 10 ml Wasser gelöst und je 200 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C bis -24 °C eingefroren.

Durch Verdünnen von 65 µl Cisplatin-SL in 10 ml Wasser wurde die Cisplatin-Arbeitslösung (AL) mit einer Konzentration von 0,01 g/l hergestellt. Wie die Stammlösung wurde die Arbeitslösung aliquotiert und bis zur Verwendung eingefroren.

Zur Herstellung des Kalibrators wurde die AL nochmals so verdünnt, dass eine Cisplatin-Lösung mit einer Konzentration von 50 ng/l entstand. Hierzu wurden 50 µl der AL-Lösung auf 10 ml Wasser aufgefüllt und gut durchmischt.

Die restlichen Kalibratoren wurden dann vom Autosampler des Atom-Absorptionsspektrometers selbständig zusammengestellt. Als Nullwert und zur Verdünnung der Kalibratorlösung diente doppelt destilliertes Wasser, welches auch zur Herstellung der Cisplatin-Lösungen verwendet wurde. In Tabelle 20 sind die Mischungsverhältnisse und die Endkonzentrationen für die Erstellung der Kalibriergeraden angegeben. Für eine Injektion wurden 20 µl in die Verdampfungseinrichtung eingespritzt.

Tabelle 20: Verdünnungen zur Erstellung der Kalibriergeraden durchgeführt durch den Autosampler des Atom-Absorptionsspektrometers

Kalibrator	Benötigtes Volumen an Aqua dest. [µl]	Benötigtes Volumen der Kalibratorlösung [µl]	End-Konzentration an Platin [ng/ml]
Cal Zero	20	0	0
1	18	2	5
2	16	4	10
3	12	8	20
4	8	12	30
5	4	16	40
6	0	20	50

3.15.5 Inprozesskontrolle durch Process Quality Control (PQC) – Proben

Die PQC-Proben dienten der Überprüfung von Richtigkeit und Präzision während der Messung. Sie wurden durch Verdünnung aus der Cisplatin-AL mit bidestilliertem Wasser hergestellt. In Tabelle 21 sind die hergestellten PQC-Proben und deren Zusammensetzung bezogen auf 10 ml Wasser dargestellt. Die hergestellten PQC-Proben wurden zu 200 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei mindestens -20 °C eingefroren. Zur Anwendung kamen die PQC-Proben zuerst nach der Erstellung der Kalibriergeraden, um deren Richtigkeit zu gewährleisten. Danach wurden sie nach jeder sechsten zu messenden Lösung und zum Abschluss nach der letzten injiziert. Die Präzision war dann hinreichend genau, wenn mindestens zwei Drittel der PQC-Proben nicht mehr als 15 % vom Nominalwert abweichen und die PQC-Probe mit dem kleinsten Nominalwert nicht mehr als 20 % vom Nominalwert differierte.

Tabelle 21: Hergestellte Process Quality Controls (PQC)-Proben, die benötigten Volumenangaben der Cisplatin-AL beziehen sich auf ein Volumen von 10 ml

PQC-Probe	Platin-Konzentration [ng/ml]	Volumen Cisplatin-AL [µl]
PQC 10	10	10
PQC 20	20	20
PQC 40	40	40

3.15.6 Lyse der Zellpellets

Die in Kapitel 3.15.3 erhaltenen Pellets wurden in 100 µl konzentrierter Salpetersäure resuspendiert und nach zehnmaligen Auf- und Abpipettieren davon 20 µl abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß, das mit 480 µl Aqua dest. gefüllt war, überführt und bis zur Verwendung zur Proteinbestimmung nach Bradford (vergl. Kap. 3.9.2) bei -20 °C eingefroren. Die restlichen 80 µl wurden mit Salpetersäure auf 300 µl aufgefüllt und solange stehen gelassen bis alle Schwebeteilchen aufgelöst waren. Zur Messung in der AAS wurden die Proben so verdünnt, dass sie im Messbereich der Kalibriergeraden lagen. Dazu waren Verdünnungen 1:1, 1:9 bis 1:19 mit doppelt destilliertem Wasser nötig.

3.15.7 Durchführung der AAS-Messung

Die Proben, die Kalibrierlösung, die PQC-Proben sowie doppelt destilliertes Wasser als Nullwert wurden in die entsprechenden Vertiefungen des Proben Tellers platziert und die Reihenfolge notiert.

Tabelle 22: Temperatur- und Zeitprogramm zur Platinbestimmung mittels AAS unterteilt in 12 Schritte.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Argonstrom [l/min]	Signalaufnahme
1	95	5,0	3	Nein
2	110	60,0	3	Nein
3	120	10,0	3	Nein
4	650	15,0	3	Nein
5	650	10,0	3	Nein
6	650	10,0	3	Nein
7	1300	10,0	3	Nein
8	1300	2,0	3	Nein
9	1300	2,0	0	Nein
10	2700	0,7	0	Ja
11	2700	2,0	0	Ja
12	2700	2,0	3	Nein

Die Messung erfolgte nach Injektion in das Graphitrohr automatisch nach dem in Tabelle 22 beschriebenen Temperaturprogramm. Alle Messungen erfolgten im „Prompt height“ Modus: Alle Proben wurden so oft vermessen, bis die jeweilige relative Standardabweichung von 5 % unterschritten wurde. Die Proben wurden somit mindestens zweimal, aber höchstens viermal vermessen. Das Probenvolumen betrug pro Messung 20 µl und wurde durch den Probenansaugkopf automatisch abgemessen und injiziert

3.15.8 Datenanalyse des Cisplatin-Uptakes

Die ermittelten Absorptionen der Kalibriergeraden wurden gegen die entsprechenden Cisplatinkonzentrationen aufgetragen und mittels Microsoft Excel[®] eine lineare Regression erstellt.

Durch Umformung Regressionsgleichung nach x , wurden durch Einsetzen der gemessenen Absorptionen die in der Probe enthaltene Platinkonzentration ermittelt. Je nach Verdünnung wurde dann die erhaltene Konzentration mit dem reziproken Verdünnungsverhältnis multipliziert, um den tatsächlichen Platingehalt zu ermitteln. Die erhaltenen Werte wurden dann durch den gemessenen Proteingehalt geteilt, um den Platingehalt pro Proteineinheit genauer zu charakterisieren und Fehler durch unvollständiges Ablösen der Zellen zu minimieren.

Nun konnten die Werte gegen die Zeit aufgetragen werden und es ergaben sich Platingehalt-Zeit-Diagramme, die durch lineare Regressionen gefittet werden konnten.

3.16 Bestimmung des intrazellulären Glutathiongehalts und des Glutathion-Effluxes

3.16.1 Grundlagen der Glutathion-Bestimmung

Glutathion ist ein Tripeptid, aufgebaut aus Glutamin, Cystein und Alanin (Vergl. Abbildung 13) [108]. Aufgrund seiner Thiolgruppe ist es in der Lage mit Xenobiotika entweder über Komplexbildung oder über die Ausbildung von kovalenten Di/Sulfidbrücken zu reagieren und diese als Substrat für MRPs erkennbar zu machen. Glutathion ist des Weiteren in der Lage mit Naphthalen-2,3-dicarbaldehyd (NDA) relativ spezifisch zu einem fluoreszierenden Isoindoladdukt zu reagieren. Dieses lässt sich bei der Wellenlänge 580 nm anregen, emittiert bei 620 nm und lässt sich zur Quantifizierung der Glutathionmenge heranziehen.

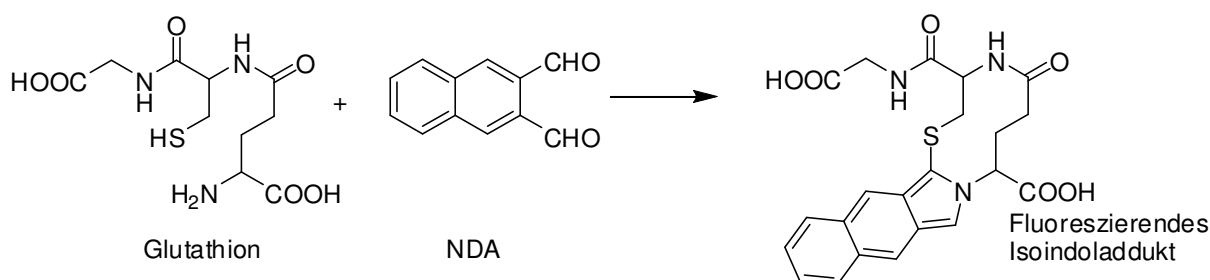


Abbildung 13: Derivatisierungsreaktion von Glutathion mit Naphthalendialdehyd (NDA) zum fluoreszierende Isoindoladdukt.

Um das oxidierte Glutathion (GSSG) bestimmen zu können, musste dieses chemisch in die reduzierte Form überführt werden. Dies wurde durch Zugabe von Dithiotreithol (DTT), einem Abkömmling der Threose mit zwei Thiolgruppen, erreicht. Dieses Molekül ist in der Lage durch Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke andere Disulfidgruppen in freie Thiolgruppen zu überführen. Die Reaktion ist schematisch in Abbildung 14 dargestellt und wurde verwendet um oxidiertes Glutathion (GSSG) in reduziertem Glutathion (GSH) zu überführen.

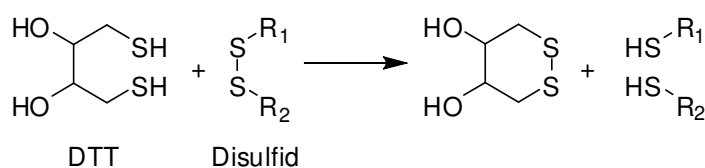


Abbildung 14: Disulfidbrücken Reduktion durch DTT.

3.16.2 Herstellung der Kalibriergeraden

In Tabelle 23 sind die Verdünnungsschritte zur Herstellung der zur halbquantitativen Bestimmung nötigen Kalibriergeraden aus der GSH-Stammlösung (vergl. Kap. 3.16.2) aufgeführt, die zur weiteren Bearbeitung noch 1 : 99 zur Arbeitslösung (AL) verdünnt werden musste. Hierzu wurden 990 µl PBS-EDTA vorgelegt und 10 µl der GSH-Stammlösung zugegeben. Wichtig war, dass alle Glutathionverdünnungen immer auf Eis gelagert wurden, da diese sehr oxidationsempfindlich sind.

Tabelle 23: Verdünnungsschritte zur Herstellung der Kalibriergeraden zur halbquantitativen Bestimmung von intrazellulärem Glutathion

Konzentration der Stammlösung [μmol/l]	Benötigtes Volumen AL [μl]	Benötigtes Volumen PBS - EDTA [μl]	Endkonzentration [μmol/l]
100	10	390	2,5
100	20	380	5
100	80	720	10
100	60	340	15
100	120	280	30
10	40	360	1
10	20	380	0,5

3.16.3 Herstellung der Qualitätskontrollen

Um die vollständige Derivatisierung des Glutathions zum Isoindoladdukt zu überwachen, wurden aus einer anderen GSH-Stammlösung Qualitätskontrollen hergestellt. Nach Verdünnung zur Arbeitslösung (vergl. Kap. 3.16.2) wurden wie in Tabelle 23 beschrieben Kontrollproben mit 0,5 und 30 μmol/l hergestellt.

3.16.4 Durchführung der intrazellulären Glutathionbestimmung

Die Zellen (MDCKII, MDCKII MRP1, MDCKII MRP2) wurden wie oben beschrieben geerntet und mit Hilfe des Casy[®]-Zellzählers gezählt. 1×10^6 Zellen wurden in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (Shortspin). Der Überstand wurde mit Hilfe einer Pipette abgesaugt ohne das Pellet zu beschädigen. Die so erhaltenen Pellets wurden dreimal in 1 ml PBS-EDTA resuspendiert und anschließend mittels Shortspin abzentrifugiert, um Überreste des Mediums und des darin enthaltenden Glutathions zu entfernen. Die vom Überstand befreiten Pellets wurden im Anschluss mit 300 μl HCl (1 mol/l) versetzt, mit einer Pipette ca. 20mal auf- und abpipettiert und für circa 30 s bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Nach Neutralisation mit 300 μl NaOH (1 mol/l) wurde mit PBS-EDTA auf 1000 μl aufgefüllt. Bei 10200 g wurde dann 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand sofort in die 96-

Well-Mikrotiterplatte pipettiert, wobei das Pellet am Boden nicht beschädigt oder aufgeschwemmt werden durfte.

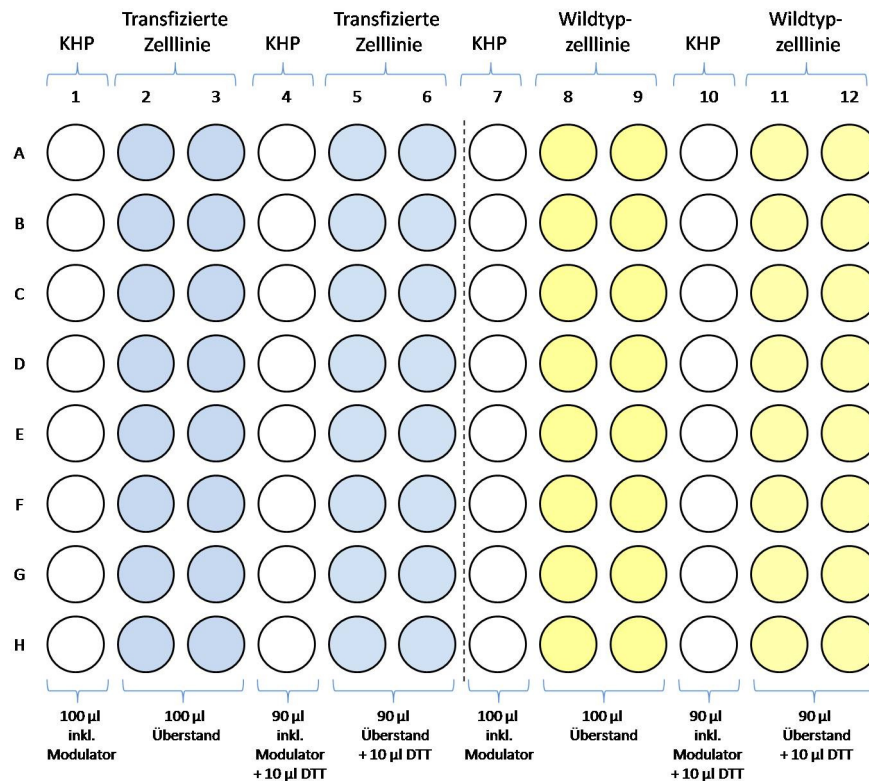


Abbildung 15: Pipettierschema für einen typischen Glutathion-Assay, mit den verschiedenen verwendeten Volumina.

Alle Proben wurden mindestens im Dublett pipettiert und zusätzlich ein Blindwert ohne Zelllysate. Bei den Wells, die im Anschluss mit DTT versetzt wurden, pipettierte man nur 90 µl ein, bei den übrigen 100 µl. Analog wurden immer zwei Kalibriergeraden erstellt. Während der Wartezeiten wurde die Platte auf Eis gelagert.

Tabelle 24: Testparameter für die intrazelluläre Glutathion-Bestimmung im Microplatereader

Anzahl der Zyklen:	50
Anzahl der Lichtblitze:	10 s^{-1}
Intervallzeit zwischen den Reihen:	1,0 s
Vermessung der Mikrotiterplatte:	Horizontal
Required Value:	50 %
Gain (595 nm / 620 nm):	- / 20
Scan-Modus:	Plate

Nachdem die Wells gefüllt waren, wurden in die entsprechenden Wells, die nur mit 90 µl befüllt waren, 10 µl einer frisch hergestellten 100 mmol/l DTT-Lösung zupipettiert. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 1 bis 2 min wurden 10 µl der NDA-Lösung in DMSO (10 mmol/l) gegeben und die Platte sofort im Microplatereader vermessen. Die Einstellungen finden sich in Tabelle 24.

3.16.5 Durchführung der Bestimmung des Glutathion-Effluxes

Die Zellen (MDCKII, MDCKII MRP1, MDCKII MRP2, 2008 und 2008 MRP1) wurden geerntet und mittels Casy[®]-Zellzähler wie oben beschrieben gezählt. Durch dreimaliges Waschen mit 5 ml KHP, Abzentrifugieren, Absaugen des Überstandes und erneutes Resuspendieren, wurden die Zellen von Resten des Nährmediums befreit. Von der so erhaltenen Zellsuspension wurden jeweils eine Million Zellen entnommen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Mit KHP wurde das Volumen auf 900 µl ergänzt und je 100 µl der entsprechenden Modulator-Verdünnung hinzupipettiert. Um möglichst physiologische Bedingungen zu erhalten, wurden die Proben in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt und geschwenkt, sodass sich die Zellen nicht anheften konnten. Ein Eppendorfgefäß wurde immer nur mit KHP versetzt und diente zur Bestimmung des Nullwerts.

Tabelle 25: Einstellungen des POLARstars[®] bei der Bestimmung des extrazellulären Glutathions.

Anzahl der Zyklen:	50
Anzahl der Lichtblitze:	10 s ⁻¹
Intervallzeit zwischen den Reihen:	1,0 s
Vermessung der Mikrotiterplatte:	Horizontal
Required Value:	50 %
Gain (595 nm / 690 nm):	- / 40
Scan-Modus:	Plate

Zu festgelegten Zeitpunkten wurden die Eppendorfgefäße aus dem Wasserbad entfernt und bei 4 °C abzentrifugiert (Shortspin). In diesem Schritt wurde der Efflux durch Minimierung der Zelloberfläche gestoppt. Nun wurde der Überstand in eine Mikrotiterplatte (96-Wells) über-

führt. Aus jedem Eppendorfgefäß wurden zweimal 100 µl und zweimal 90 µl in die Wells pipetiert (Siehe schematische Abbildung 15).

Nach Zugabe von 10 µl einer 100 mmol/l DTT-Lösung in die mit 90 µl befüllten Wells, wurde zur Derivatisierung die gesamte Platte mit 10 µl einer 1 mmol/l NDA-Lösung versetzt und die Platte sofort im Fluoreszenzreader mit den in Tabelle 25 beschriebenen Einstellungen vermessen.

3.16.6 Datenanalyse der Glutathion-Bestimmungen

Zunächst wurden die ermittelten Blindwerte mit den entsprechenden Modulatorkonzentrationen mit und ohne DTT von den gemessenen Fluoreszenzwerten abgezogen, sodass eventuell Eigenfluoreszenz des Modulators oder andere gebildete fluoreszierende Addukte vor der Berechnung entfernt werden konnten. Die so erhaltenen Sättigungskurven wurden mit Hilfe von Graphpad Prism[®] 5.0 analysiert. Zur Berechnung wurde die Gleichung zur Bestimmung der einphasigen Assoziation (Gleichung 2) herangezogen.

Gleichung 2

$$Y = Y_0 + (Plateau - Y_0) * (1 - \exp(-K * x))$$

Y_0 ist der Wert, der für Y ermittelt wurde, wenn x (Zeit) ist gleich Null ist. Das Plateau bezeichnet den Y Wert, der bei einem unendlichen Zeitpunkt x ermittelt wird. K ist eine Zähl-Konstante, die in reziproken Zeiteinheiten angegeben wird und immer die umgekehrte Einheit wie x haben muss. Ist die Einheit von x Minuten (min) ist die Einheit von $K = [min^{-1}]$.

Die so erhaltenen Top-Werte (Maximal-Werte) wurden dann halblogarithmisch gegen den Logarithmus der Modulator-Konzentration aufgetragen und die IC_{50} wie in Kap. 3.13.5 beschrieben ermittelt.

3.17 Allgemeine Methoden der Datenanalyse

3.17.1 Statistische Kennzahlen

Aus Messreihen mit $n \geq 3$ Messwerten x_i wurden die folgenden statistischen Kennzahlen berechnet. Zunächst der arithmetische Mittelwert Gleichung 3.

Gleichung 3

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Weiterhin wurde aus dem Mittelwert die Varianz s^2 ermittelt (Gleichung 4). Die Varianz ist ein Maß für die Streuung der statistisch ausgewerteten Messwerte und dient zusätzlich als Grundlage für den sogenannten F -Test.

Gleichung 4

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Durch Wurzelziehen aus der Varianz erhält man die Standardabweichung s_x (vergleiche Gleichung 5). Wie die Varianz ist auch die Standardabweichung ein Maß für die Streuung der Messwerte x_i .

Gleichung 5

$$s_x = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Aus Gleichung 6 wurde der Standardfehler des Mittelwerts s_M berechnet. Diese statistische Kennzahl gibt die Streuung des Mittelwerts \bar{x} der Stichprobe um den Mittelwert der Grundgesamtheit μ an.

Gleichung 6

$$s_M = \frac{s_x}{\sqrt{n}}$$

Alle Gleichungen wurden aus [109] entnommen.

3.17.2 Statistische Tests: F - und t -Test

Alle statistischen Tests wurden unter der Annahme durchgeführt, dass es sich um eine Normalverteilung der Grundgesamtheit der Messwerte handelt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf $p \leq 0,05$ festgesetzt.

Mit dem F -Test werden Varianzen von Stichproben mit einem Probenumfang von n_1 und n_2 auf signifikante Unterschiede untersucht. Dazu wird mit Gleichung 7 der F -Wert berechnet und mit tabellierten F -Werten verglichen.

Gleichung 7

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}; \text{es gilt: } s_1 > s_2$$

Der tabellierte F -Wert ist abhängig von den Freiheitsgraden f der Messreihen ($f_1 = n_1 - 1$ und $f_2 = n_2 - 1$) sowie von der Irrtumswahrscheinlichkeit p . Ist der tabellierte F -Wert kleiner als der errechnete, so bedeutet dies, dass die Varianzen signifikant unterschiedlich zueinander sind und somit auch die Grundgesamtheiten verschieden sind.

Bei einigen Versuchen wurde eine Sonderform des F -Tests eingesetzt [110]. Mit Hilfe dieses statistischen Tests wurde entschieden, ob die nichtlineare Regression mit der Drei Parameter Logistischen Gleichung, d. h. mit einem fixierten Hill-Koeffizienten von eins, oder mit der Vier Parameter Logistischen Gleichung berechnet wurde. Dieser F -Wert wurde anhand von Gleichung 8 bestimmt:

Gleichung 8

$$F = \frac{\frac{SS_1 - SS_2}{f_1 - f_2}}{\frac{SS_1}{f_2}}$$

Die Variablen SS_1 und f_1 entsprechen der Summe der Fehlerquadrate und der Anzahl der Freiheitsgrade bei Auswertung mit der Drei Parameter Logistischen Gleichung. Gleiches gilt für die Auswertung mit der Vier Parameter Logistischen Gleichung für SS_2 und f_2 . Wurde anhand des F -Wertes kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Modellen festgestellt, wurde der Hill-Koeffizient n_H bei der Auswertung des Experiments mit eins fixiert. Dieser Test

wurde durchgeführt, da sich bei der nichtlinearen Regression häufig alleine durch Einbringen zusätzlicher Variablen das Bestimmtheitsmaß R^2 eines Modells verbessert. Dient dieser Wert als Entscheidungsgrundlage bei der Auswahl des Modells, können also irrelevante Parameter in die Auswertung mit einbezogen werden.

Mit Hilfe des t -Test können die Mittelwerte zweier Messreihen mit einem Probenumfang n_1 und n_2 anhand eines zweiseitigen ungepaarten t -Tests auf einen statistisch signifikanten Unterschied geprüft werden. Zunächst erfolgte die Berechnung der mittleren, gewichteten Standardabweichung beider Datenreihen s_D aus den Varianzen (s_1^2 und s_2^2) siehe Kapitel 3.17.1.

Gleichung 9

$$s_D = \sqrt{\frac{s_1^2 * (n_1 - 1) + s_2^2 * (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Nun lässt sich die Prüfgröße PG nach Gleichung 10 [92] berechnen:

Gleichung 10

$$PG = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_D} * \sqrt{\frac{n_1 * n_2}{n_1 + n_2}}$$

Diese Prüfgröße PG wurde mit einem tabellierten Wert t verglichen, der von der Anzahl der Freiheitsgrade f (mit $f = n_1 + n_2 - 2$) und der Irrtumswahrscheinlichkeit p (s. o.) abhängig ist. War der tabellierte Wert t kleiner als die Prüfgröße PG , bedeutete dies einen signifikanten Unterschied der beiden Mittelwerte und somit eine Zuordnung der Messreihen zu unterschiedlichen Grundgesamtheiten.

3.17.3 Korrelationen

Korrelationen wurden nach Pearson [110] durchgeführt. Die Berechnung der p -Werte erfolgt beidseitig. Die graphische Darstellung erfolgt als lineare Regression mit Visualisierung des 95 % Konfidenzintervalls mit Hilfe von GraphPad Prism® 5.01.

3.17.4 Ausreißer-Test

Zur Evaluierung von Ausreißern aus einer Korrelation wurde ein Ausreißer-Test nach Grubbs durchgeführt [110]. Zunächst musste für jeden Datenpunkt der Quotient aus y-Wert und x-Wert gebildet werden. Aus diesen Quotienten (Q) wurden der Mittelwert (\bar{x}) (nach Gleichung 3) und die Standardabweichung (s_x) (nach Gleichung 5) errechnet. Durch Einsetzen in Gleichung 11 wurden Z-Werte erhalten.

Gleichung 11

$$Z = \frac{|\bar{x} - Q|}{s_x}$$

Jeder Z-Wert wurde mit tabellierten Werten verglichen. Ist Z größer als der tabellierte Wert für die Anzahl n der Quotienten, ist dieser Wert ein signifikanter Ausreißer mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$.

3.18 Eingesetzte Computerprogramme

Die Auswertung der Ergebnisse, Experimente und Versuche sowie deren graphische Aufbereitung und Darstellung erfolgte Computer gestützt mit folgenden Programmen:

Microsoft Excel[®] XP, Microsoft Cooperation (Redmond, USA)

GraphPad Prism[®] 5.01, GraphPad Software Incorporated (San Diego, USA)

ACD/logD 5.16, Advanced Chemistry Development Inc. (Toronto, Kanada)

Alle Strukturformeln wurden mit Hilfe von ChemOffice 6.0, bzw. dem dort integrierten ChemDraw Ultra 6.0 erstellt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung der Zelllinien mittels Western-Blot

Der Western Blot stellt eine bekannte Methode dar, die zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Proteinen mittels Antikörpern angewendet wird [92]. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit sollte mittels Western Blot nachgewiesen werden, welche Resistenzproteine P-gp, MRP1 und MRP2 in den einzelnen, verwendeten Zelllinien vorhanden sind. Da es sich bei den MDCKII Zellen um eine Nierenzelllinie handelt, ist es wahrscheinlich, dass neben den erwünschten noch andere Resistenzproteine der Hundewirtszelle nativ mit exprimiert werden (Vergl. Kapitel 1.5.5 und 1.5.6).

An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass zur Anfärbung der Proteine nur Antikörper verwendet wurden, die gegen die humanen Proteine gerichtet sind, sodass nicht sicher gestellt werden kann, ob alle entsprechenden Hundeproteine mit erfasst wurden. Die entsprechende Sequenzhomologie der Proteine ist in der Regel sehr hoch. Bei MRP1 liegt sie zwischen Mensch und Hund z.B. bei 92 % [111], bei MRP2 bei 83 % [112], sodass eine Kreuzreaktion zumindest angenommen werden kann.

4.1.1 Auswertung der Blots

In Abbildung 16 sind Beispiele von erhaltenen Blots dargestellt. In den Blots für die MRPs konnten die entsprechenden MRP-Proteine in den transfizierten Zelllinien wie erwartet nachgewiesen werden. Es existieren zum Teil größere Unterschiede in der Höhe der Expression. In den 2008 MRP1 konnte die größte Menge an MRP1 detektiert werden, während in der ebenfalls transfizierten Zelllinie MDCKII MRP1 trotz gleich eingesetzter Menge an Protein nur deutlich weniger MRP1 vorhanden war. Interessanterweise konnte in der entsprechenden Nierenzelllinie MDCKII weder MRP1 noch MRP2 angefärbt werden, obwohl es für eine Nierenzelllinie zu erwarten gewesen wäre, da beide Transporter dort nativ exprimiert werden sollten (siehe auch Tabelle 26). Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass der entsprechende Antikörper an eine nicht hochkonservierte Position des menschlichen Proteins bindet, die im caninen Protein nicht vorhanden ist. Da Kreuzreaktionen für die verwendeten MRP-Antikörper im Gegensatz zum P-gp-Antikörper [93] nicht bekannt sind, stellt dies durchaus eine wahrscheinliche Möglichkeit dar. Es kann also davon ausgegangen werden, dass trotz des negativen Ergeb-

nisses MRPs in den MDCKII Zellen vorhanden sind. Des Weiteren spricht für diese Vermutung, dass auch in den 2008 Wildtypzellen eine gewisse Menge MRP1 detektiert werden konnte und das MRP1 ähnlich wie P-gp im Körper fast ubiquitär exprimiert wird. In Tabelle 26 ist die von Conrad et al. ermittelte Häufigkeit der üblichen Resistenzproteine in den Hundenieren im Vergleich zum menschlichen Gewebe dargestellt [112].

Tabelle 26: Relative Häufigkeit der häufigsten Resistenzproteine in Hundenieren im Vergleich zur menschlichen Niere nach Conrad et al. [112]. Für MRP2 standen keine Ergebnisse auf Proteinebene zur Verfügung, sodass Ergebnisse auf RNA-Ebene angegeben wurden. Modifiziert nach [112].

P-gp (Protein)		MRP1 (Protein)		MRP2 (mRNA)	
Hund	Mensch	Hund	Mensch	Hund	Mensch
++	++	++	(+)	+	(+)

Die humanen Zelllinien 2008 WT und 2008 MRP1 entstammen dem Epithel eines unbehandelten Ovarialkarzinoms. Da für Ovarien und besonders Epithelgeweben bekannt ist, dass in ihnen häufig Resistenzproteine, darunter besonders MRP1 und P-gp, nativ exprimiert werden, [59, 113], war dieser Befund zu erwarten.

Während mit den Antikörpern für MRP1 und MRP2 nur die zu erwartenden Proteine in den entsprechenden Zelllinien detektiert werden konnten, so wurden in allen verwendeten Zelllinien zum Teil nicht unerhebliche Mengen an P-Glykoproteinen nachgewiesen. Die 2008 MRP1 und 2008 Zelllinien enthielten dabei den geringsten Anteil an P-gp.

4.1.2 Zusammenfassung der Western Blot-Ergebnisse

Alle verwendeten transfizierten (MDCKII MRP1, MDCKII MRP2 und 2008 MRP1) und selektierten Zelllinien (A2780 ADR) enthielten die erwünschten Proteine, sodass man von einer erfolgreichen Transfektion bzw. Selektion der Zellen ausgehen kann. Das P-Glykoprotein konnte in großen Mengen in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Obwohl in den MDCKII WT Zellen außer P-gp keine anderen Resistenzproteine detektiert werden konnten, ist dies nicht gleichbedeutend mit einem Nichtvorhandensein dieser Proteine, da die verwendeten Antikörper gegen das menschliche Protein gerichtet sind und zumindest in den MDCKII Zellen das entsprechende canine Protein nicht mit detektiert werden muss.

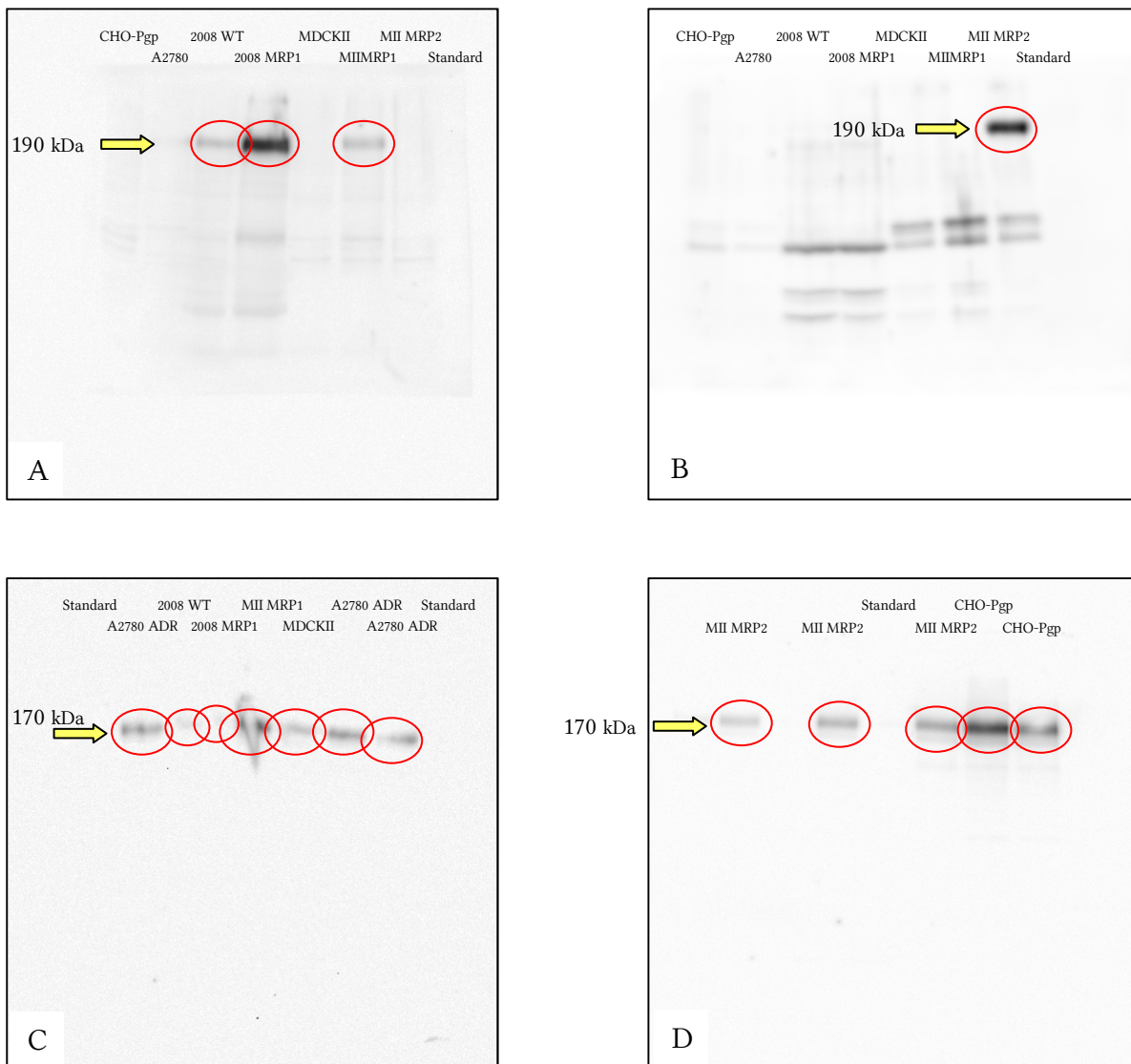


Abbildung 16: Beispiele für Western Blots. A: Mit MRP1 Antikörper, B: Mit MRP2 Antikörper, C und D: Mit P-gp Antikörper angefärbt. Die Größeneinordnung (kDa) ergab sich aus dem mitgelaufenen Größenstandard.

Wie in Kapitel 4.1.1 erwähnt, wurden sowohl der canine MRP1 – Transporter selbst als auch dessen Transporteigenschaften von Conrad et al. näher charakterisiert. Es zeigte sich, dass trotz der sehr hohen Übereinstimmung in der Sequenzhomologie ein Unterschied in den Transporteigenschaften vorliegt. Im Gegensatz zum humanen Protein kann das canine kein Daunorubicin, *Vinca* Alkaloide oder Etoposid transportieren. Es besitzt aber dennoch die Eigenschaft Calcein-AM zu transportieren, was zu Verfälschungen des verwendeten Calcein-Akkumulations-Assays hätte führen können [112].

Die 2008 Ovarialkarzinom-Zelllinien enthalten nur eine geringe Menge an P-gp und neben MRP1 keine anderen der in dieser Arbeit untersuchten Resistenzproteine.

4.2 Funktionelle Charakterisierung von MRP2 mittels CDFD

4.2.1 CDFD-Assay im Röhrchen

CDFD und CDF sind, wie in Kapitel 3.11 erwähnt, Substrate von MRP2 [114]. Intrazellulär wird das CDFD enzymatisch zum fluoreszierenden CDF umgesetzt. Wird CDFD zu einer MRP2 exprimierenden Zelllinie gegeben, so wird im Vergleich zu einer Zelllinie ohne MRP2 deutlich weniger CDFD ins Zellinnere gelangen, da es von MRP2 aktiv aus der Zelle transportiert wird. Zusätzlich wird auch das umgesetzte CDF aktiv aus der Zelle transportiert. Es ist also zu erwarten, dass eine mit MRP2 transfizierte Zelllinie deutlich weniger Fluoreszenz zeigt als die entsprechende nicht transfizierte Zelllinie. Im Durchflusszytometer kann spezifisch die intrazelluläre Fluoreszenz gemessen werden, sodass diese Bestimmungsmethode der Fluoreszenzmessung für diese Anwendung gut geeignet ist. Begonnen wurde mit Röhrchenversuchen, da nur mit diesen eine Kinetik aufgenommen werden kann.

In Abbildung 17 sind die Fluoreszenz-Zeitdiagramme für die Zelllinienpaare 2008 WT und 2008 MRP2 sowie MDCKII WT und MDCKII MRP2 für zwei verschiedene CDFD-Konzentrationen dargestellt. Alle Kurven zeigen den typischen Verlauf einer Sättigungskurve. Während jedoch bei den MDCKII-Zelllinien ein deutlicher Unterschied in der Höhe der Sättigungskurven zu erkennen ist, zeigt das Zelllinienpaar 2008 WT und 2008 MRP2 keine signifikante Abweichung in ihren Kurvenverläufen.

Dieser zunächst unerwartete Befund lässt sich wie folgt erklären: MRP2 ist in den Ovarien normalerweise nativ nicht vorhanden und wird nur in polarisierten Zellen exprimiert, da es nur apikal in die Membranen polarisierter Zellen eingebaut werden kann. Möglicherweise handelt es sich bei dieser Ovarialkarzinomzelllinie um keine polarisierte Zelllinie, sodass der Transporter nicht zur Zellmembran transportiert werden kann. In der entsprechenden Veröffentlichung von Hooijberg et al. zeigte diese Zelllinie zwar eine Aktivität [115], die aber deutlich geringer war als die der MRP1 transfizierten Variante. Möglicherweise ist die Menge des exprimierten MRP2 zu gering und unterschreitet die Messbarkeit in dieser Versuchsanordnung. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die 2008 MRP2 Zelllinie nicht weiter untersucht und die weiteren Untersuchungen mit MDCKII MRP2 Zellen durchgeführt.

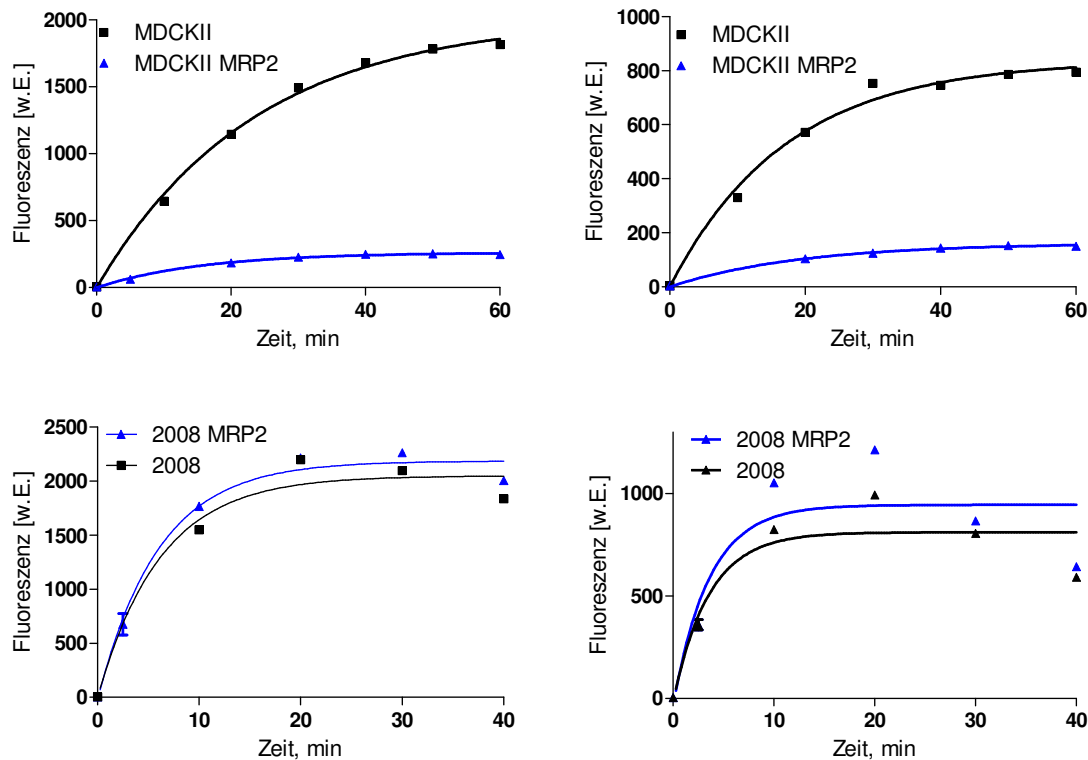


Abbildung 17: Fluoreszenz-Zeitdiagramme für den CFD- Assay für die Zelllinienpaare MDCKII MRP2 und MDCKII (oben) und 2008 MRP2 und 2008 (unten). Links bei einer CFD - Konzentration von 1,0 $\mu\text{mol/l}$ und rechts mit 0,5 $\mu\text{mol/l}$. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardfehler eines repräsentativen Experiments einer Dreifachbestimmung.

Um sicher zu stellen, dass es sich bei der verringerten intrazellulären Fluoreszenz in der MDCKII MRP2-Zelllinie um einen ABC-Transporter vermittelten Effekt handelt, wurde zunächst Natriumazid verwendet. Natriumazid ist ein klassischer ATPase-Inhibitor und hemmt als solcher auch die ATP-Bindungsstelle der ABC-Transportern [116]. In Abbildung 18 ist ein Versuch mit und ohne Zusatz von 10 $\mu\text{mol/l}$ Natriumazid abgebildet.

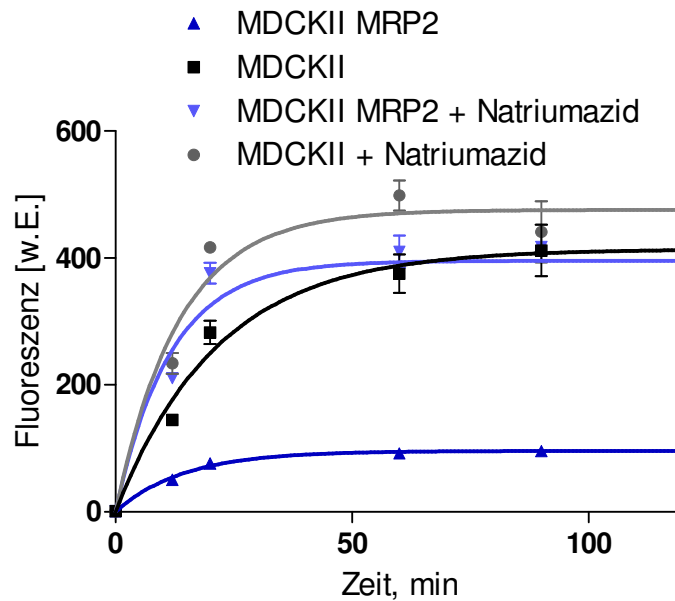


Abbildung 18: Fluoreszenz-Zeit-Diagramme von MDCKII MRP2 und MDCKII Zellen mit und ohne Zusatz von 10 $\mu\text{mol/l}$ Natriumazid. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Dreifachbestimmung aus einer Serie von zwei unabhängigen Versuchen.

Wie zu erwarten, führte die Inhibition der ATPase-Aktivität in der transfizierten Zelllinie zu einer deutlich erhöhten Fluoreszenz, die sich der des Wildtyps annäherte. Auch der Wildtyp (MDCKII) zeigte eine durch Azid ausgelöste Erhöhung der intrazellulären Fluoreszenz. Dies war insofern zu erwarten, da es sich bei den MDCKII-Zelllinien um Nierenzelllinien handelt, die nativ schon eine Vielzahl von Transportern darunter auch ABC-Transporter wie P-gp, MRP1 und MRP2 (vergl. auch Kapitel 4.1) [112], exprimieren sollte. So ist auch bei unspezifischen Modulatoren grundsätzlich ein Fluoreszenzanstieg in der Wildtyp Zelllinie zu erwarten, der allerdings nicht größer sein sollte als der der transfizierten Zelllinie.

Im nächsten Schritt war nun zu überprüfen, ob bekannte Modulatoren einen Effekt auf die intrazelluläre Fluoreszenz haben würden. Hierzu wurden Substanzen ausgesucht, die möglichst spezifisch für MRP2 sind: Indometacin, Probenecid und Sulfinpyrazon. Diese drei Verbindungen sind bekannte, aber eher schlechte Inhibitoren von MRP2 und mussten in sehr hohen Konzentrationen zugegeben werden [117-119]. Theoretisch müsste mit steigender Modulatorkonzentration auch ein entsprechender Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten sein. In Abbildung 17 sind am Beispiel von Indometacin die Fluoreszenz-Zeitdiagramme bei verschiedenen Modulatorkonzentrationen aufgetragen. Aus der Abbildung wird deutlich, dass es konzentrationsabhängig zu einem Anstieg der Fluoreszenz innerhalb der MRP2 transfizierten Zelllinie kommt.

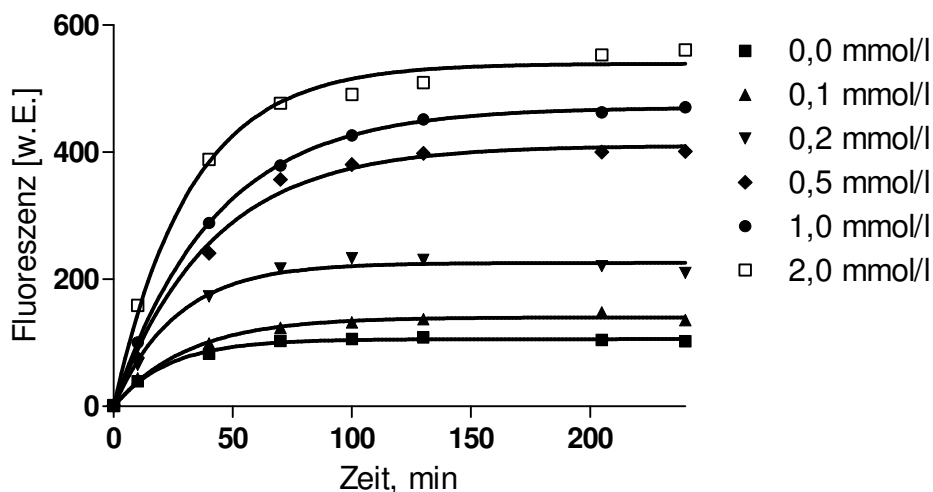


Abbildung 19: Fluoreszenz-Zeit-Kurven für Indometacin in MDCKII MRP2 Zellen. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines repräsentativen Experiments als Dreifachbestimmung.

Durch Fitten der erhaltenen Sättigungskurven mittels einphasiger Assoziationsgleichung und anschließendem Auftragen der Maximalwerte gegen die logarithmische Modulatorkonzentration, resultiert eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve, die in Abbildung 20 für das Beispiel Indometacin abgebildet ist. Aus der sigmoidalen Kurve wiederum konnte durch Berechnung über die Vier-Parameter-Logistische-Gleichung (Gleichung 1) der IC_{50} -Wert ermittelt werden. Der IC_{50} -Wert für Indometacin betrug ungefähr $335 \mu\text{mol/l}$.

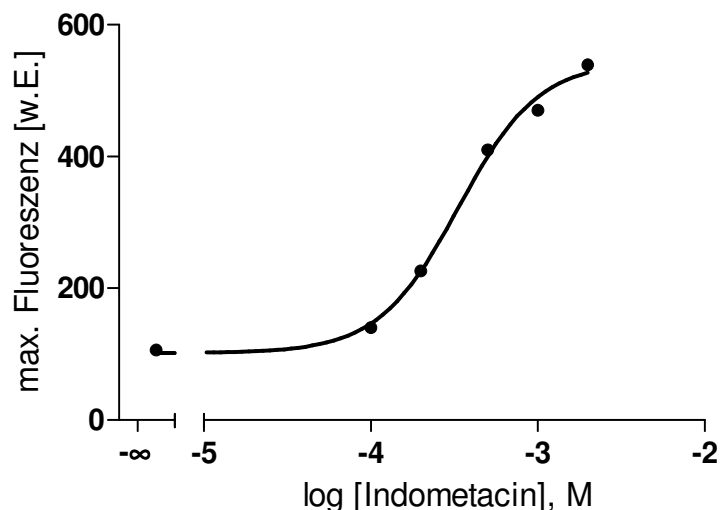


Abbildung 20: Dosis-Wirkungskurve für Indometacin im CDFD-Assay. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines repräsentativen Experiments als Dreifachbestimmung, aus einer Serie von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Indometacin ist von den gemessenen Inhibitoren der potenteste. Bei Probenecid und Sulfinpyrazon ist es aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit und ihrer Toxizität unmöglich den

Maximalwert der sigmoidalen Kurve zu erreichen, sodass diese für die Verwendung als Standardinhibitoren nicht in Frage kamen (Vergl. Abbildung 21).

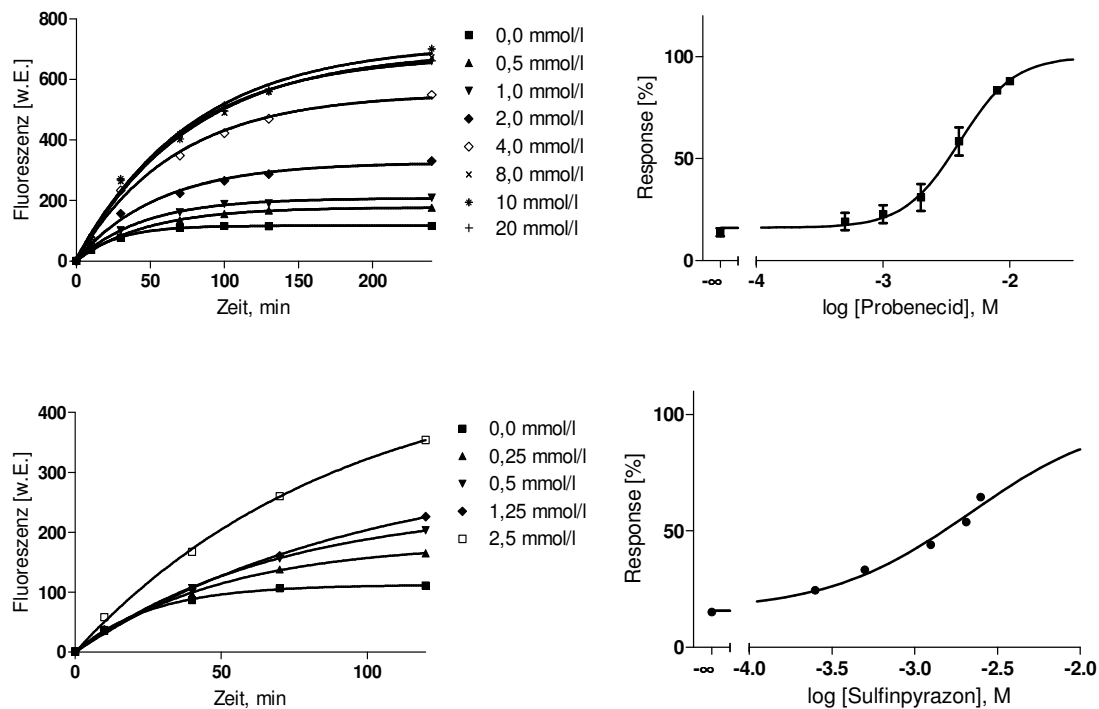


Abbildung 21: Standardinhibitoren Probenecid (oben) und Sulfinpyrazon (unten) von MRP2 im CDFD-Assay. Links Fluoreszenz-Zeit Verläufe und rechts Dosis-Wirkungskurven. Abgebildet sind jeweils Mittelwert und Standardfehler eines repräsentativen Experiments als Dreifachbestimmung. Das Maximum der Dosis-Wirkungskurve von Sulfinpyrazon wurde über den Maximalwert von Indometacin festgelegt.

4.2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der CDFD-Assay Röhrchen-Versuche

Der Assay ist grundsätzlich zur Aktivitätsbestimmung von Modulatoren an MRP2 geeignet. Die verwendeten Standardinhibitoren zeigten einen deutlichen Effekt auf die Aufnahme von CDFD. Indometacin ist von den Standardinhibitoren der beste, während Probenecid der schlechteste ist. Sulfinpyrazon müsste sich zwischen die beiden Inhibitoren einreihen, jedoch konnte aufgrund von Löslichkeitsproblemen keine Maximalinhibition erreicht werden. Aus diesem Grund wurde als Standardsubstanz zur Positivkontrolle in späteren Versuchen, auch für den später ausschließlich verwendeten Calcein-AM-Assay, Indometacin verwendet. Aufgrund der aufwändigen Versuchsdurchführung wurde dieser Assay für die Durchführung in 96-Well Mikrotiterplatten modifiziert (Vergl. Kapitel 10.4 im Anhang).

4.3 Funktionelle Charakterisierung mittels Calcein-AM

Calcein-AM ist ein bekanntes Substrat für MRP1, MRP2 sowie P-gp [100, 104]. Im Gegensatz zu P-gp sind MRP1 [100] und auch MRP2 [120] in der Lage, zusätzlich das negativ geladene Anion Calcein zu transportieren. Aus diesem Grund lag es nahe, ein gemeinsames Substrat für alle drei Resistenzproteine zu verwenden, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu erreichen. Für P-gp wurde der schon in der Dissertation von Dr. Müller etablierte und detailliert beschriebene Assay verwendet, sodass an dieser Stelle auf eine ausführliche Beschreibung verzichtet wird [95]. Auch zum Quenching-Effekt der Cobalt(II)ionen auf die Fluoreszenz wird auf diese Arbeit verwiesen. Für MRP1 und MRP2 wurde der Assay neu etabliert.

4.3.1 Etablierung des Calcein-AM-Assays für MRP1

Für MRP1 sind bereits Modulatoren bekannt, die die Transportfunktion von MRP1 hemmen können. Zu den MRP1-Modulatoren gehört auch das Indometacin [121], das im späteren Verlauf auch als Standardsubstanz zur Validierung der Versuchsbedingungen eingesetzt wurde. Zunächst musste aber festgestellt werden, ob ein messbarer Unterschied zwischen der transfizierten Zelllinie 2008 MRP1 und der Wildtypzelllinie vorhanden ist. Dazu wurden beide Zelllinien mit Calcein-AM inkubiert und mittels Microplate Reader vermessen. Bei der Aufnahme der Kinetik wurde deutlich, dass wesentlich weniger Fluoreszenz in der 2008 MRP1- als in der Wildtyp-Zelllinie zu beobachten war. Beim Vergleich der errechneten Steigungen der linearen Bereiche ergibt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Faktor von 2-3 (z.B. Abbildung 22). Dieser Unterschied spiegelt sich in den Dosis-Wirkungskurven im Nullwert ($-\infty$) wider.

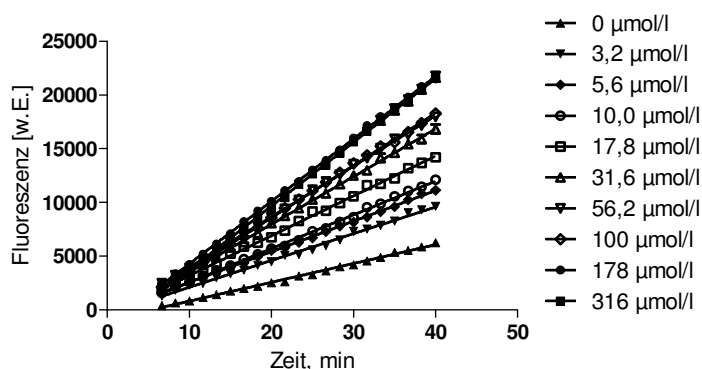


Abbildung 22: Fluoreszenz-Zeit-Diagramm in Anwesenheit verschiedener Indometacin-Konzentrationen in 2008 MRP1 Zellen. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung.

Im Folgenden sollte bestätigt werden, dass Indometacin in der Lage ist die intrazelluläre Fluoreszenz zu erhöhen. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von Indometacin zugesetzt und neue Fluoreszenz-Zeitdiagramme aufgenommen. In Abbildung 22 ist ein typisches Fluoreszenz-Zeitdiagramm von Indometacin im Calcein-AM-Assay abgebildet. Die Zunahme der intrazellulären Fluoreszenz mit steigender Indometacin-Konzentration ist deutlich zu erkennen. Nach Berechnung der entsprechenden Steigungen aus dem linearen Bereich der Graphen und Auftragen dieser gegen die logarithmische Indometacin-Konzentration ergibt sich eine typische sigmoidale Kurve (Abbildung 23). Aus dieser wiederum lässt sich die IC_{50} für Indometacin ableiten, die als Maß für den inhibitorischen Effekt herangezogen werden kann. Die IC_{50} von Indometacin betrug im Mittel ungefähr $10 \mu\text{mol/l}$. Es ist gut zu erkennen, dass die Fluoreszenz des Wildtyps weitgehend konstant bleibt und sich die Kurven der beiden Zelllinien ungefähr im jeweiligen Maximum treffen.

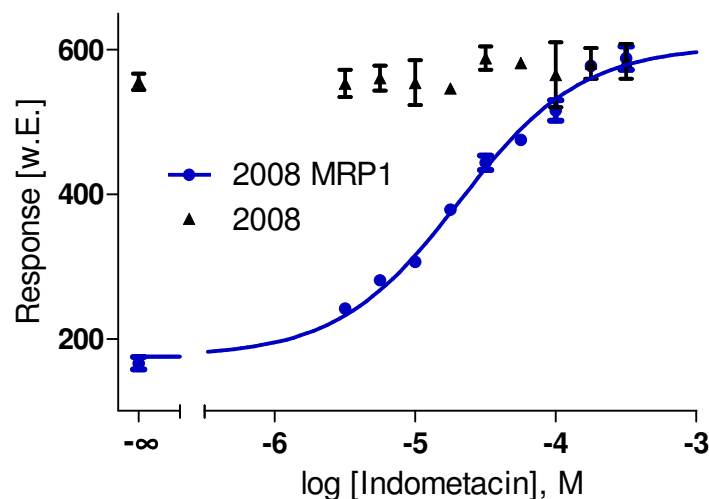


Abbildung 23: Dosis-Wirkungskurve von Indometacin in 2008 MRP1 Zellen und Wildtyp Zellen. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments mit Doppelbestimmung.

4.3.2 Funktioneller Nachweis von anderen Transportproteinen in MRP1 transfizierten Zellen

Bei der Charakterisierung von Substanzen in MRP1 transfizierten 2008 MRP1 Zellen fiel auf, dass bei manchen Testsubstanzen die transfizierte Zelllinie einen fast identischen Anstieg der Fluoreszenz wie der entsprechende Wildtyp zeigte. Dies soll hier anhand der Testsubstanz RB_I_009b kurz demonstriert und erläutert werden. RB_I_009b ist ein Chinazolin-Derivat, das von R. Bogner synthetisiert wurde. Einige Chinazolinderivate sind als MRP1 Inhibitoren

bekannt [122], weshalb RB_I_009b getestet wurde. In Abbildung 24 ist die Strukturformel der Substanz dargestellt.

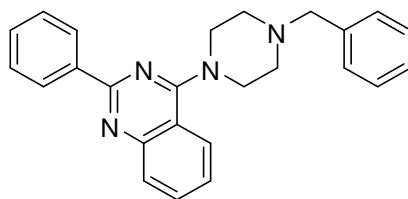


Abbildung 24: Strukturformel von RB_I_009b.

In Abbildung 25 (links) sind die Dosis-Wirkungs-Kurven von RB_I_009b für die Zelllinie 2008 WT und für 2008 MRP1 gegenübergestellt.

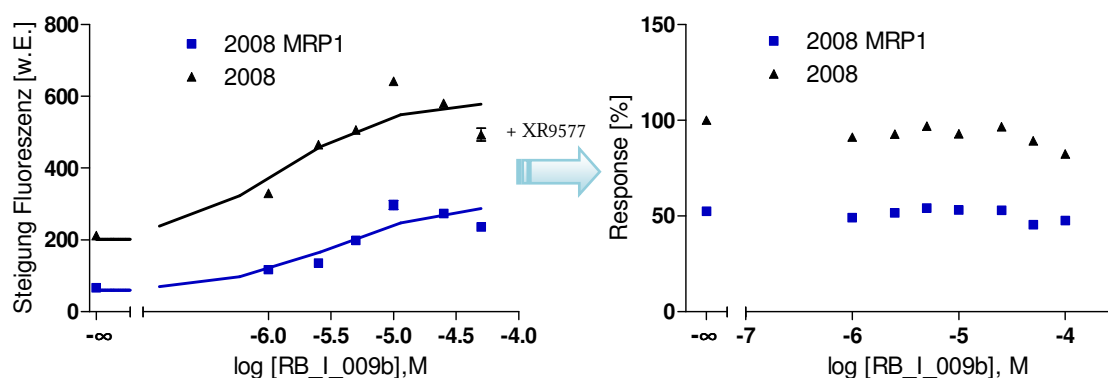


Abbildung 25: Dosis-Wirkungskurve von RB_I_009b in 2008 MRP1 bzw. 2008 WT Zellen ohne Zusatz von XR9577 (links) und nach Zusatz von XR9577 (rechts). Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung.

Sowohl der Kurvenverlauf als auch die IC_{50} -Werte ($IC_{50} \text{ (MRP1)}: 3,09 \pm 0,51 \text{ } \mu\text{mol/l}$; $IC_{50} \text{ (WT)}: 1,21 \pm 0,82 \text{ } \mu\text{mol/l}$) sind bei beiden Zelllinien sehr ähnlich. Da Chinazoline bekannte Inhibitoren von P-gp [122] sind, wären die Kurvenverläufe durch das in 2008 MRP1 nativ exprimierte P-gp erklärbar (vergl. Kapitel 4.1). Um dies genauer zu untersuchen, wurde die Substanz im etablierten Calcein-AM-Assay für P-gp getestet.

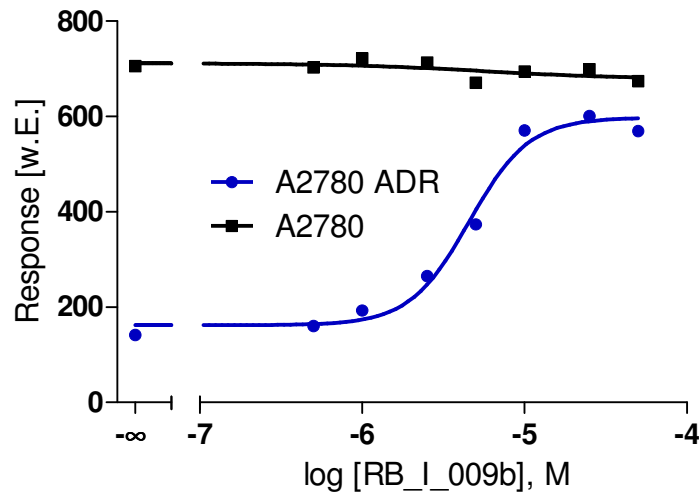


Abbildung 26: Dosis-Wirkungskurve von RB_I_009b in A2780 ADR und WT Zelllinie. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

RB_I_009b ist ein P-gp Modulator mit einer IC_{50} von $2,67 \pm 0,66 \mu\text{mol/l}$. Dieser Wert ähnelt sowohl den in den MRP1 transfizierten 2008 MRP1 als auch den im Wildtyp gemessenen Werten. Es könnte sich also um das gleiche Resistenzprotein handeln. Um diese These zu überprüfen, wurde zusätzlich der selektive P-gp – Inhibitor XR9577 eingesetzt [123]. Durch dessen Einsatz soll festgestellt werden, ob der Effekt von RB_I_009b zumindest im Wildtyp aufgehoben werden kann. Gewählt wurde eine Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ XR9577, um eine Vollinhibition zu gewährleisten [124]. In Abbildung 25 (rechts) ist der Effekt von XR9577 auf die Hemmwirkung von RB_I_009b in 2008 Zellen dargestellt. Weder im Wildtyp noch in der transfizierten Zelllinie ist ein Effekt zu erkennen. Dennoch bleibt ein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien erkennbar, was darauf schließen lässt, dass ein oder mehrere Resistenzproteine selektiv gehemmt werden konnten, während der MRP1 vermittelte Transport von Calcein-AM bestehen bleibt. Um dies zu verifizieren, wurde mittels verschiedener Indometacin-Konzentrationen überprüft, ob die Funktionalität des MRP1 Proteins erhalten blieb (Abbildung 27). Auch in Anwesenheit von XR9577 konnte ein konzentrationsabhängiger Fluoreszenzanstieg innerhalb der Zelle beobachtet werden, was zeigt, dass eine selektive Inhibition von MRP1 möglich ist.

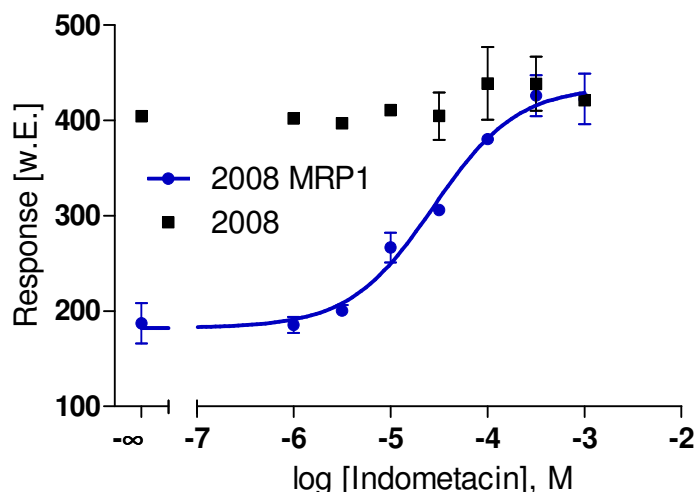


Abbildung 27: Dosis-Wirkungskurve von Indometacin in Anwesenheit des selektiven P-gp-Blockers XR9577. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines repräsentativen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n > 3$ Experimenten.

Diese Beobachtung belegten auch Jekerle et al. in ihren Untersuchungen. Sie zeigten auch, dass XR9577 in der Lage ist BCRP zu hemmen [123]. Da bei den Western-Blot Untersuchungen in allen Zelllinien, MDCKII, MDCKII MRP1 und MDCKII MRP2, P-gp nachgewiesen werden konnte, wurden bei allen nachfolgenden Versuchen mit den MRP-Zelllinien 10 $\mu\text{mol/l}$ XR9577 zugefügt, um die Aktivität von Resistenzproteinen wie P-gp oder auch BCRP zu unterdrücken. Dadurch konnte die Aktivität an den MRPs selektiv charakterisiert werden.

4.3.3 Vergleich der biologischen Daten mit Literaturdaten

Der Vergleich der ermittelten pIC_{50} -Werte einiger bekannter Inhibitoren mit Literaturdaten diente der Überprüfung des Aussagewertes des Assays. In einem Patent von Sarkadi et al. und einer Veröffentlichung von Leier et al. wurden ähnliche, auf Calcein-AM basierende Assays gefunden, die bekannte MRP1-Substrate und deren IC_{50} -Werte beinhalten [125, 126]. Aus diesen Veröffentlichungen wurden einige Substanzen ausgewählt und mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit verglichen (vergl. Tabelle 27).

Tabelle 27: Tabelle bekannter MRP1 Inhibitoren mit ihren pIC_{50} -Werten (aus [125], bzw. MK571 aus [126]) mit den in diesem Assay gemessenen Werten.

Modulator	pIC_{50} gemessen	pIC_{50} Literatur
Indometacin	$4,945 \pm 0,045$	5,000 – 4,699
MK571	$5,189 \pm 0,073$	5,481
Verapamil	$4,591 \pm 0,152$	5,398 – 5,097
Chinin	$4,131 \pm 0,132$	4,000 – 4,301
Cyclosporin A	$5,317 \pm 0,040$	5,699 – 5,398
Benzbromaron	$5,386 \pm 0,084$	5,301 – 5,000
Sulfinpyrazon	$3,221 \pm 0,086$	3,522 – 3,301
Probenecid	$3,212 \pm 0,042$	3,301 – 3,097

Durch Auftragen der gemessenen Werte gegen die Literaturwerte wurde die in Abbildung 28 dargestellte Korrelation erhalten. Die Ergebnisse der Korrelation legen nahe, dass die beiden Assays weitgehend identische Ergebnisse liefern. Als einziger Wert fällt der pIC_{50} für Verapamil aus der Korrelation heraus (siehe Residuen-Plot Abbildung 29). Nach dem Ausreißer-Test nach Grubbs ist der Wert für Verapamil jedoch kein signifikanter Ausreißer (vergl. Kapitel 3.17.4).

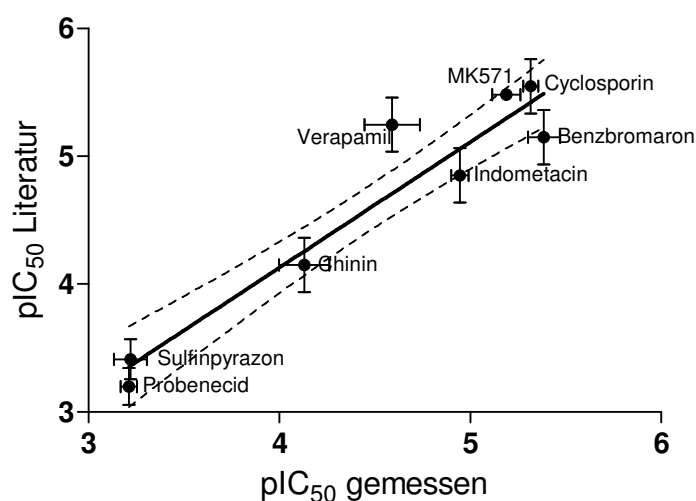


Abbildung 28: Korrelation nach Pearson der gemessenen und aus der Literatur bekannten pIC_{50} -Werte aus [125], bzw. MK571 [126]. Das R^2 beträgt 0,911 und die Wahrscheinlichkeit, dass die Daten nicht korrelieren liegt nach Pearson bei $p=0,0002$.

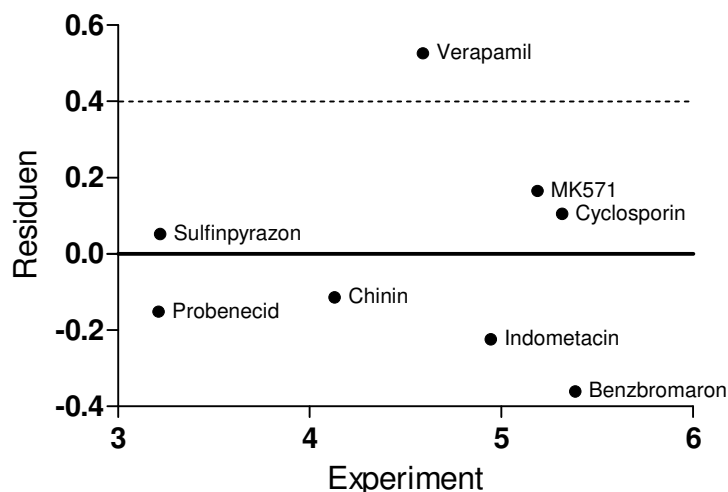


Abbildung 29: Residual-Plot der gemessenen Werte gegenüber der Ausgleichsgeraden. Hier wird deutlich, dass besonders Verapamil von der Ausgleichsgeraden abweicht ($> 0,4$ logarithmische Einheiten).

In den eigenen Untersuchungen wurden grundsätzlich schlechtere Werte für Verapamil gemessen. Hierfür kann es mehrere Gründe geben: In der dem Patent zugrundeliegenden Untersuchung wurde z.B. kein Inhibitor für den P-gp vermittelten Transport zugesetzt. Der dort angegebene Wert entspricht dem Wert, der für Verapamil in P-gp transfizierten Zellen ermittelt und auch in dieser Arbeit reproduziert werden konnte (ermittelter Wert für Verapamil an P-gp: $pIC_{50}=5,275 \pm 0,109$, Hill-Koeffizient, 1). Des Weiteren konnte von Leslie et al. für Verapamil eine Abhängigkeit der inhibitorischen Aktivität von der Glutathion-Konzentration nachgewiesen werden, sodass eine geringere oder höhere GSH-Konzentration in den verwendeten Zelllinien ursächlich für die Unterschiede sein kann (vergl. auch Kapitel 4.9.2) [127].

4.3.4 MRP1 Calcein-AM-Assay in MDCKII MRP1 und MDCKII

Im Folgenden wird dargestellt, warum anstelle der 2008 MRP1 nicht die MDCKII MRP1 Zelllinie verwendet wurde. In Abbildung 30 ist ein Fluoreszenz-Zeit-Diagramm für verschiedene Indometacin-Konzentrationen dargestellt. Wie für die 2008 MRP1 Zelllinie ergibt sich auch hier zum Beginn der Messung ein linearer Zusammenhang zwischen der Zeit und dem Fluoreszenzanstieg.

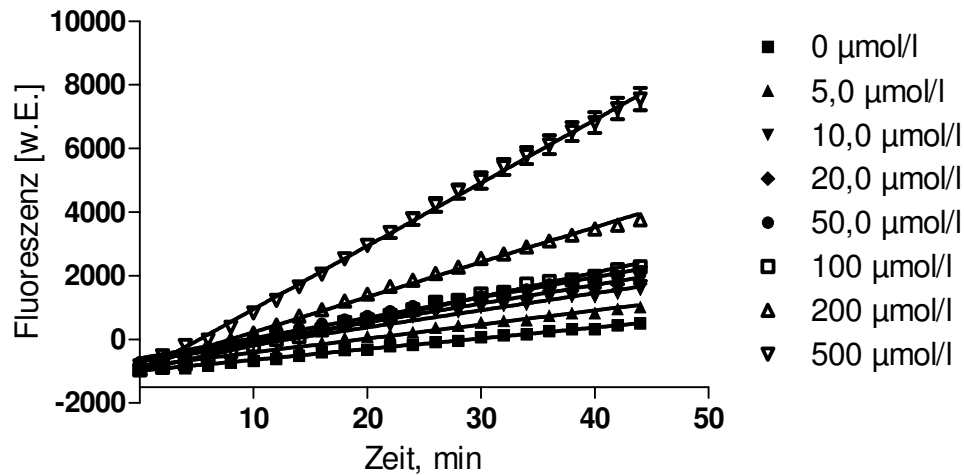


Abbildung 30: Fluoreszenz-Zeit Diagramm von verschiedenen Indometacin-Konzentrationen in MDCKII MRP1 Zellen. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von mindestens drei Experimenten.

Das Auftragen der Steigung gegen die logarithmische Konzentration der eingesetzten Indometacin-Konzentration ergibt die in Abbildung 31 dargestellte Dosis-Wirkungskurve.

In Abbildung 31 (links) ist zu erkennen, dass ab einem gewissen Punkt die Kurve der Wildtyp Zelllinie in etwa parallel mit der der transfizierten Zelllinie verläuft, was für die Präsenz eines gemeinsamen Transporters in beiden Zelllinien spricht. Wird der in der Abbildung gekennzeichnete Ausschnitt vergrößert, wird eine zweite Kurve sichtbar. Diese zeigt den typischen Kurvenverlauf, in der sich der Wildtyp und die transfizierte Zelllinie in einem Maximum treffen.

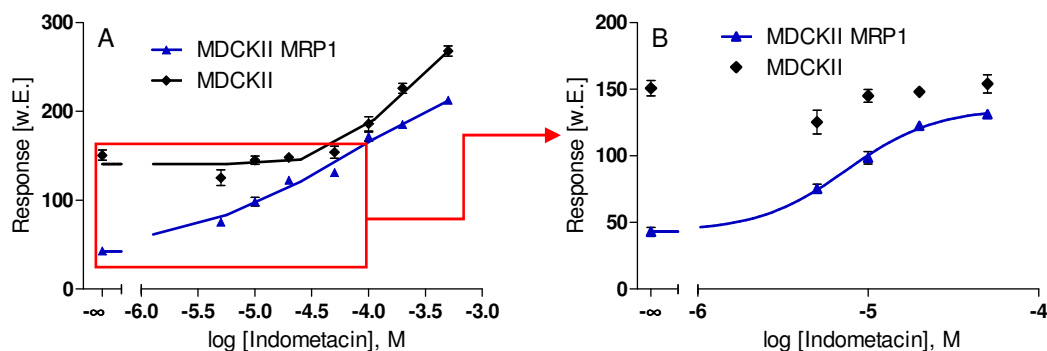


Abbildung 31: A: Dosis-Wirkungskurve von Indometacin in MDCKII MRP1 und MDCKII Zellen. Ab einer Konzentration von 100 µmol/l Indometacin verlaufen die zwei Kurven in etwa parallel. B: Ausschnitt aus A. Zweite Dosis-Wirkungskurve. Wildtyp und transfizierte Zelllinie treffen sich im Maximum. Abgebildet sind Dosis-Wirkungskurven eines typischen Experiments als Vierfachbestimmung aus einer Serie von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Beim Vergleich der erhaltenen IC_{50} -Werte aus der MDCKII MRP1-Zelllinie (IC_{50} Indometacin: $12,93 \pm 5,38 \mu\text{mol/l}$) mit dem Wert aus den 2008 MRP1 Zellen (IC_{50} Indometacin: $11,39 \pm 1,18 \mu\text{mol/l}$) zeigt sich ein fast identischer IC_{50} -Wert. Diese „zweite“ kleinere Kurve des Ausschnittes ist auch in der Dosis-Wirkungskurve aus der Dissertation von Dr. Müller [95] zu erkennen, jedoch fand sie dort keine Anwendung, weswegen dort ein deutlich höhere IC_{50} -Wert von $42,21 \pm 9,79 \mu\text{mol/l}$ ermittelt wurde. In Tabelle 28 sind Vergleichswerte für MRP1-Inhibitoren zwischen den beiden Zelllinien 2008 MRP1 und MDCKII MRP1 aufgelistet. Die Unterschiede zwischen den pIC_{50} -Wert-Paaren der Tabelle könnten durch zusätzliche Transporter ausgelöst werden, die ebenfalls in der Lage sind, Calcein-AM zu transportieren. Wie in Abbildung 31 (links) gezeigt, werden diese Transporter durch Indometacin in hohen Konzentrationen gehemmt. Da möglicherweise auch andere Inhibitoren als Indometacin bei hohen Konzentrationen zu einer Hemmung dieser Transporter führen und es damit zu Überlagerungen der Kurvenverläufen kommen kann, könnte der pIC_{50} -Wert falsch bestimmt werden. Dies könnte auch die erhöhten Aktivitätswerte von MK571 erklären. Im späteren Verlauf der Arbeit ergaben sich Hinweise, dass es sich bei dem Transporter um canines MRP2 handeln könnte (vergl. Kapitel 4.3.5).

Tabelle 28: Vergleich von MRP1 Inhibitoren im Calcein-AM-Assay in den verschiedenen Zelllinien 2008 MRP1 und MDCKII MRP1. Alle Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten. Flurbiprofen ist ein bekannter Inhibitor für MRP1 [121, 128]

Modulator	pIC_{50} (2008 MRP1)	pIC_{50} (MDCKII MRP1)
MK571	$5,189 \pm 0,073$	$5,599 \pm 0,180$
Flurbiprofen	$4,016 \pm 0,031$	$4,226 \pm 0,101$
Indometacin	$4,945 \pm 0,045$	$4,916 \pm 0,193$

Zusammenfassend resultiert, dass der Assay ebenfalls in den MDCKII MRP1 Zellen funktioniert sowie vergleichbare Ergebnisse liefert wie in den 2008 MRP1 Zellen, vorausgesetzt die Affinität des zweiten Transporters ist so viel schlechter, dass es zu keinen oder nur geringen Überlagerungen der Kurvenverläufe kommt.

4.3.5 Etablierung des Calcein-AM-Assay für MRP2

Auch für MRP2 stellen sowohl Calcein als auch Calcein-AM ein Substrat dar [120]. Daher wurde auch hier der gleiche Akkumulationsassay wie für MRP1 etabliert. Wie in Kapitel 4.2.2 schon demonstriert, ist Indometacin ein Inhibitor von MRP2. Deshalb wurde dieses auch hier zur ersten Testung herangezogen. In Abbildung 32 (oben) ist ein Fluoreszenz-Zeit-Diagramm für verschiedene Konzentrationen von Indometacin dargestellt. Es ergibt sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Fluoreszenz. Die resultierende Dosis-Wirkungskurve zeigt den erwarteten sigmoidalen Kurvenverlauf (Abbildung 32 (unten)).

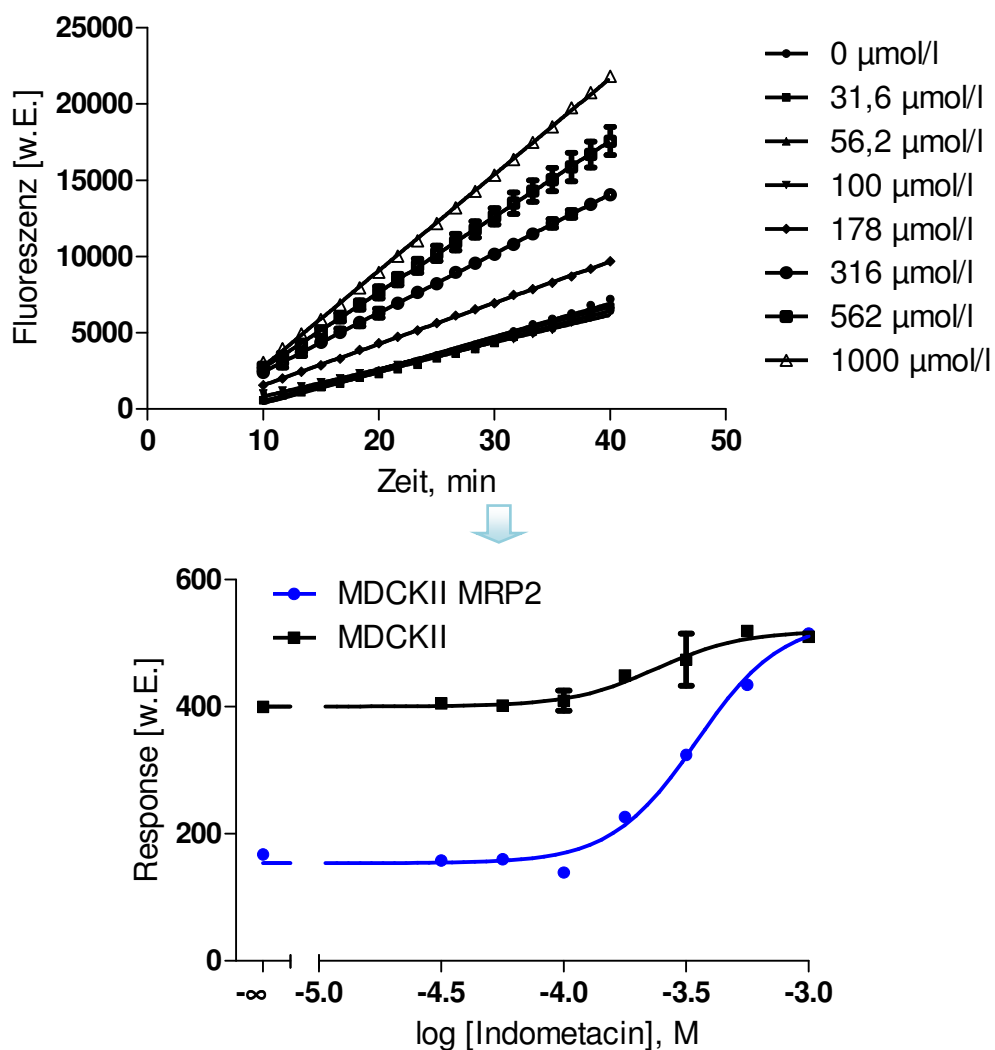


Abbildung 32: Oben: Fluoreszenz-Zeit-Diagramm von verschiedenen Indometacin Konzentrationen in MDCKII MRP2 Zellen. Unten: Resultierende Dosis-Wirkungskurve im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experimentes als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n > 3$ Experimenten. Auffällig ist eine leichte Aktivierung des Calcein Effluxes zu Beginn der Messung (vergl. Kapitel 4.11).

Der Vergleich von Wildtyp und transfizierter Zelllinie ergibt ein identisches Maximum. Allerdings zeigt auch der Wildtyp eine leichte Erhöhung der Response, wahrscheinlich hervorgerufen durch den caninen MRP2-Transporter. Im Gegensatz zur Durchflusszytometrie können in den Fluoreszenz-Readern nicht nur lebende Zellen vermessen werden, sodass toxische Effekte viel deutlicher zu tragen kommen. Aus diesem Grund eigneten sich Probenecid und Sulfinpyrazon nicht für die Bestimmung im Fluoreszenz-Reader. Um weitere Standards zu testen, wurden Cyclosporin A, MK571 und Verapamil verwendet. Verapamil ist kein Inhibitor für MRP2 und wurde aus diesem Grund als Negativkontrolle eingesetzt [127]. In Tabelle 29 sind die Ergebnisse im Vergleich mit Literaturdaten dargestellt.

Tabelle 29: pIC₅₀-Werte einiger Standardinhibitoren von MRP2 im Vergleich zu Literaturdaten aus [129].

Modulator	pIC ₅₀ gemessen	pIC ₅₀ nach [129]
Indometacin	3,644 ± 0,140	3,560 ± 0,229
Sulfinpyrazon	< 3,0	< 3,0
Probenecid	n.d.	3,084 ± 0,005
Verapamil	< 3,5	< 4,0
MK571	4,703 ± 0,161	4,674 ± 0,023
Cyclosporin A	4,869 ± 0,061	5,252 ± 0,016

n.d. = nicht durchgeführt

Aus der Tabelle wird deutlich, dass alle Substanzen, die einen inhibitorischen Effekt auf MRP2 haben sollen, auch in diesem Testsystem einen Effekt zeigen. Die Substanzen, die effektiv sein sollen, zeigen auch keinen Anstieg der Fluoreszenz. Insgesamt konnten trotz der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe (Calcein-AM bzw. Glutathion-Methylfluorescein [129]) und Bestimmungsmethoden (Fluoreszenz-Reader bzw. FACS) relativ ähnliche Ergebnisse erzielt werden.

4.4 Verbindungen vom Benzimidazoltyp (LM-Verbindungen) in Calcein-AM-Assays

4.4.1 Allgemeiner Aufbau der LM-Verbindungen

Die sogenannten LM-Verbindungen wurden von Lars Möllmann synthetisiert und in dieser Arbeit in allen angegebenen Calcein-AM-Assays (MRP1, MRP2, P-gp) auf ihre biologische Aktivität untersucht. Abgeleitet wurden die Strukturen von P-gp Aktivatoren insbesondere vom QB11 [130]. Als gemeinsame Grundstruktur weisen die LM-Verbindungen eine Benzimidazolpartialstruktur auf, die das Zentrum der Verbindungen darstellt. Die Substanzen unterscheiden sich in der aliphatischen und aromatischen Substitution der Imidazolstickstoffe. Eine der Alkylseitenketten beinhaltet in der Regel eine Ketofunktion in β -Position zum Stickstoff, die eventuell gegen eine Hydroxygruppe oder eine Amidfunktion ausgetauscht wurde. In Abbildung 33 ist der generelle Aufbau der Verbindungen schematisch dargestellt.

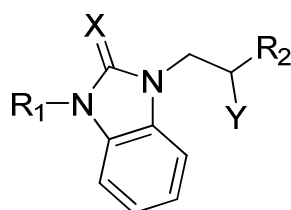


Abbildung 33: Allgemeiner Aufbau einer LM-Verbindung. X = Sauerstoff (O) oder Iminfunktion (NH); Y = Keton (=O), Hydroxygruppe (-OH) oder Säureamid (-CONH-R₂); R₁ und R₂ = verschiedene aliphatische und aromatische (auch substituierte) Reste.

4.4.2 Biologische Aktivität an MRP1 und MRP2

Einige der getesteten Strukturen zeigten inhibitorische Aktivität sowohl in MRP1 als auch MRP2 transfizierten Zellen. In Tabelle 30 sind die inhibitorisch wirksamen LM-Verbindungen mit Aktivitätsdaten aufgeführt, während in Tabelle 31 die nicht aktiven oder toxischen aufgelistet sind. Alle aktiven Verbindungen zeigen einen typischen sigmoidalen Kurvenverlauf in der halblogarithmischen Auftragungsweise wie in Abbildung 34 beispielhaft dargestellt. Bei der Durchführung mit MDCKII MRP2 Zellen zeigte auch hier der Wildtyp einen ähnlichen, aber deutlich flacheren Kurvenverlauf im Vergleich zur transfizierten Zelllinie (vergl. Kapitel 4.3.5).

Im Folgenden sollen Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt und am Ende ein generelles Modell für einen MRP1 und MRP2-Inhibitor vom Typ der LM-Verbindungen skizziert werden.

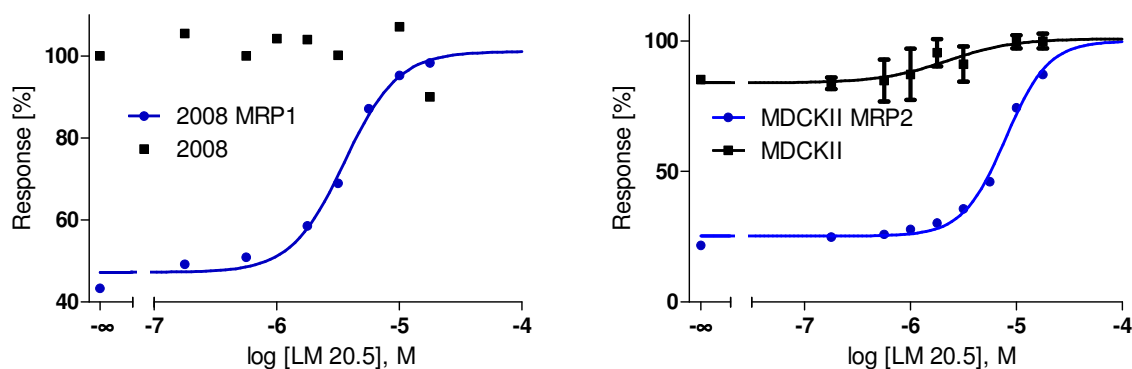


Abbildung 34: Dosis-Wirkungskurven für LM 20.5 gemessen im Calcein-AM Akkumulationsassay in MRP1 (links) bzw. MRP2 (rechts) transfizierten Zellen. Dargestellt ist jeweils ein typisches Experiment als Doppelbestimmung aus einer Serie von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Werden die pIC_{50} -Werte für die beiden Proteine verglichen, so fällt auf, dass grundsätzlich alle Modulatoren gegen MRP1 eine höhere inhibitorische Aktivität besitzen als gegen MRP2.

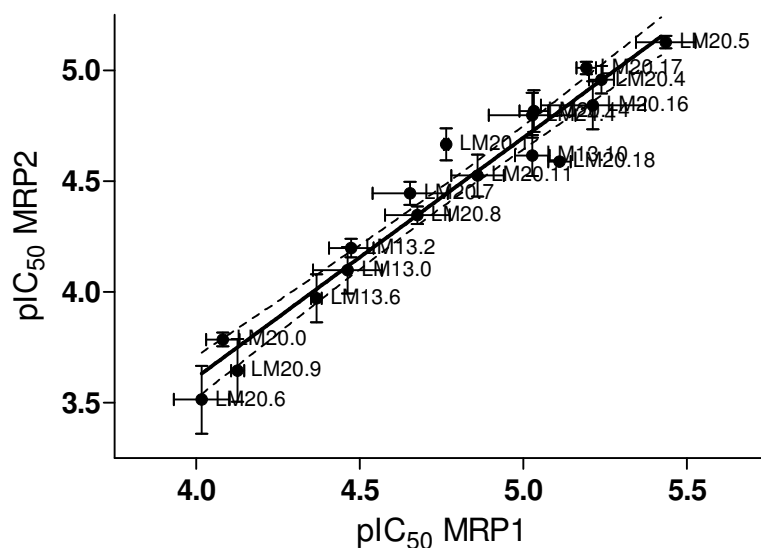


Abbildung 35: Korrelation der pIC_{50} -Werte von MRP1 gegen die pIC_{50} -Werte von MRP2. Es besteht eine hohe Korrelation zwischen den Aktivitäten der beiden Proteine mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,949.

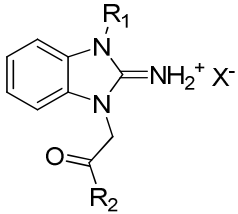
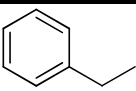
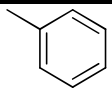
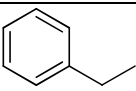
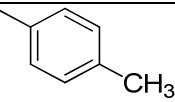
Werden die erhaltenen pIC_{50} -Werte aus dem MRP1-Assay gegen die entsprechenden Werte aus dem MRP2-Assay aufgetragen, so ergibt sich eine Gerade mit einer Steigung von $1,082 \pm 0,063$ und einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,949. Daraus lässt sich zum einen schließen, dass es eine sehr hohe Ähnlichkeit der Bindungsstellen für die LM-Verbindung in beiden Transportern

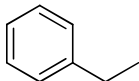
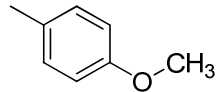
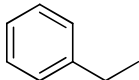
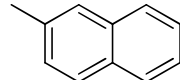
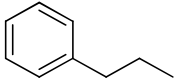
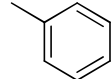
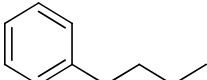
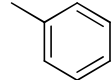
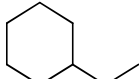
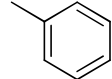
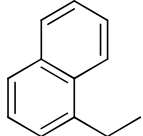
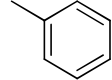
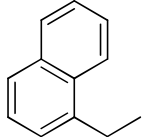
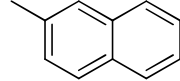
geben muss und dass zum anderen die gleichen Struktur-Wirkungsbeziehungen für beide Transporter gelten müssen. Erklären lässt sich dieses Ergebnis dadurch, dass für die beiden Transporter eine Aminosäuresequenz-Übereinstimmung von ca. 50 % und eine Übereinstimmung in den Substraten bzw. Modulatoren von fast 100 % bekannt ist [54]. Die beiden Proteine unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Affinität zu einzelnen Substraten [53]. Im Fall der LM-Verbindungen ist die Affinität zu Gunsten von MRP1 verschoben. Die Geradengleichung zur Errechnung der $pIC_{50(MRP2)}$ -Werte für LM-Verbindungen ergibt sich wie folgt:

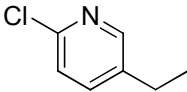
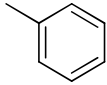
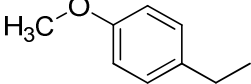
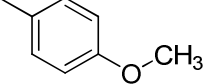
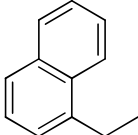
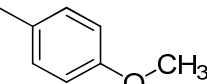
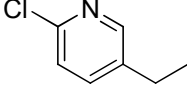
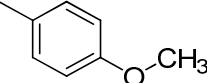
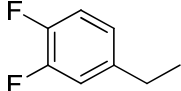
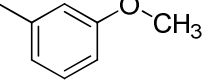
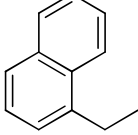
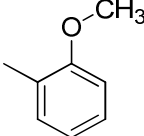
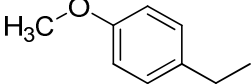
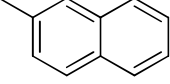
$$pIC_{50(MRP2)} = pIC_{50(MRP1)} * 1,082 - 0,712$$

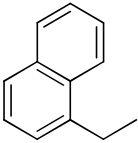
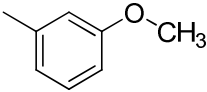
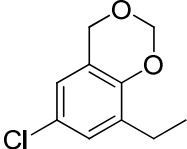
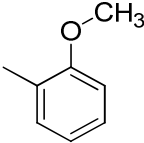
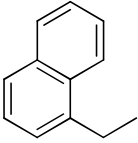
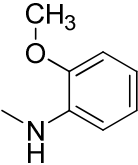
Es ist also ausreichend die LM-Verbindungen nur in einem der beiden Assays zu untersuchen und durch Einsetzen in die Gleichung den entsprechenden Wert zu ermitteln. Aufgrund des hohen Bestimmtheitsmaßes für die Werte zwischen den beiden Proteinen kann die Erläuterung der Struktur-Wirkungsbeziehungen für beide Proteine zusammen erfolgen.

Tabelle 30: Strukturformeln aller inhibitorisch wirkender LM-Verbindungen.

					
Name	R ₁	R ₂	Protein	IC ₅₀ [μmol/l] pIC ₅₀	Hill-Koeffizient
LM 13.0			MRP1	35,16 ± 8,63	1
				4,462 ± 0,105	
			MRP2	69,85 ± 5,57	2,819 ± 0,706
				4,157 ± 0,035	
LM 13.2			MRP1	33,90 ± 5,28	1
				4,474 ± 0,068	
			MRP2	63,53 ± 6,06	3,203 ± 0,103
				4,198 ± 0,042	

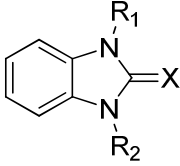
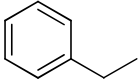
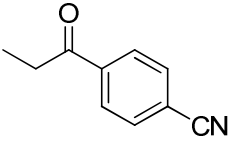
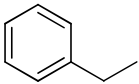
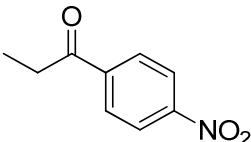
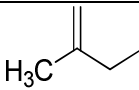
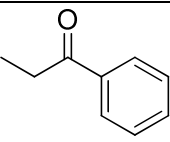
Name	R ₁	R ₂	Protein	IC ₅₀ [μmol/l] pIC ₅₀	Hill- Koeffizient
LM 13.6			MRP1	42,92 ± 1,88	1
				4,368 ± 0,019	
			MRP2	108,7 ± 25,3	2,627 ± 0,651
				3,972 ± 0,108	
LM 13.10			MRP1	9,431 ± 1,188	1
				5,028 ± 0,053	
			MRP2	24,57 ± 4,91	1,583 ± 0,193
				4,616 ± 0,093	
LM 20.0			MRP1	82,92 ± 10,22	4,656 ± 0,597
				4,081 ± 0,051	
			MRP2	164,1 ± 11,3	7,283 ± 1,878
				3,786 ± 0,031	
LM 20.1			MRP1	17,19 ± 0,03	3,119 ± 0,460
				4,765 ± 0,006	
			MRP2	19,86 ± 4,88	2,895 ± 0,156
				4,667 ± 0,072	
LM 20.3			MRP1	301,0 ± 129,7	1
				3,549 ± 0,191	
			MRP2	k. E.	-
				k. E.	
LM 20.4			MRP1	6,151 ± 0,713	3,691 ± 0,423
				5,213 ± 0,050	
			MRP2	10,33 ± 1,41	1,977 ± 0,223
				4,989 ± 0,062	
LM 20.5			MRP1	3,664 ± 0,799	3,053 ± 0,901
				5,436 ± 0,091	
			MRP2	7,469 ± 0,474	1,704 ± 0,398
				5,127 ± 0,028	

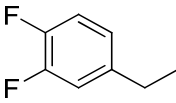
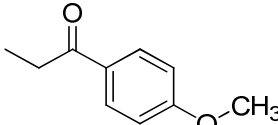
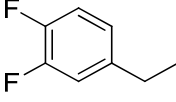
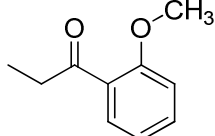
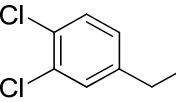
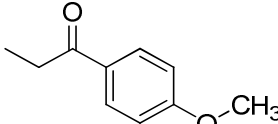
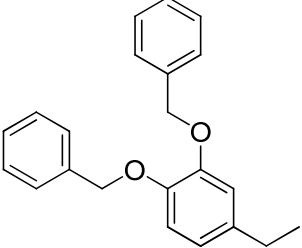
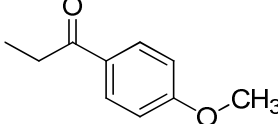
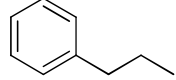
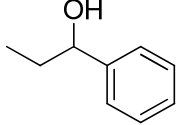
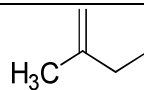
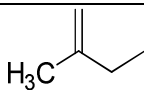
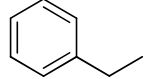
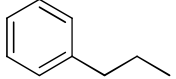
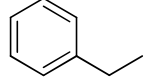
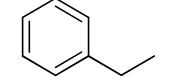
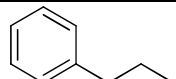
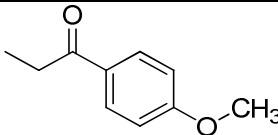
Name	R ₁	R ₂	Protein	IC ₅₀ [μmol/l] pIC ₅₀	Hill-Koeffizient
LM 20.6			MRP1	97,74 ± 19,90	1
				4,015 ± 0,085	
			MRP2	319,8 ± 119,2	2,111 ± 1,587
				3,514 ± 0,154	
LM 20.7			MRP1	22,18 ± 5,96	2,202 ± 0,842
				4,654 ± 0,115	
			MRP2	36,03 ± 4,15	1,804 ± 0,084
				4,445 ± 0,052	
LM 20.8			MRP1	21,45 ± 4,53	3,542 ± 0,402
				4,676 ± 0,099	
			MRP2	45,18 ± 4,25	1,978 ± 0,060
				4,346 ± 0,040	
LM 20.9			MRP1	74,93 ± 3,44	1,557 ± 0,452
				4,126 ± 0,020	
			MRP2	234,5 ± 78,3	1,700 ± 0,474
				3,646 ± 0,142	
LM20.11			MRP1	13,90 ± 2,24	3,150 ± 0,327
				4,860 ± 0,069	
			MRP2	70,12 ± 5,99	2,103 ± 0,106
				4,525 ± 0,095	
LM 20.14			MRP1	9,328 ± 0,913	1
				5,032 ± 0,043	
			MRP2	15,50 ± 3,50	2,733 ± 1,026
				4,817 ± 0,094	
LM 20.16			MRP1	6,405 ± 2,420	2,359 ± 0,906
				5,213 ± 0,159	
			MRP2	14,67 ± 3,88	1,983 ± 0,431
				4,843 ± 0,108	

Name	R ₁	R ₂	Protein	IC ₅₀ [μmol/l] pIC ₅₀	Hill-Koeffizient
LM 20.17			MRP1	6,430 ± 0,503	2,222 ± 0,780
				5,193 ± 0,035	
			MRP2	9,764 ± 0,643	2,204 ± 0,622
				5,011 ± 0,028	
LM 20.18			MRP1	7,773 ± 0,617	2,390 ± 1,118
				5,110 ± 0,034	
			MRP2	25,78 ± 2,41	1,726 ± 0,201
				4,589 ± 0,004	
LM 24.4			MRP1	9,712 ± 3,125	2,990 ± 0,177
				5,027 ± 0,133	
			MRP2	18,62 ± 3,78	4,565 ± 1,361
				4,798 ± 0,101	

k. E. = kein Effekt

Tabelle 31: Strukturformeln aller im MRP1 und MRP2 Calcein-AM-Assay inaktiven oder toxischen Verbindungen.

			
Bezeichnung	X	R ₁	R ₂
LM 13.1	$=\text{NH}_2^+\text{Br}^-$		
LM 13.3	$=\text{NH}_2^+\text{Br}^-$		
LM 20.2	$=\text{NH}_2^+\text{Br}^-$		

Bezeichnung	X	R ₁	R ₂
LM 20.10	$=\text{NH}_2^+\text{Br}^-$		
LM 20.12	$=\text{NH}_2^+\text{Br}^-$		
LM 20.13	$=\text{NH}_2^+\text{Br}^-$		
LM 20.15	$=\text{NH}_2^+\text{Br}^-$		
LM 21.1	$=\text{NH}_2^+\text{Br}^-$		
LM 23.1	$=\text{NH}_2^+\text{Br}^-$		
LM 23.2	$=\text{NH}_2^+\text{Br}^-$		
LM 23.3	$=\text{NH}_2^+\text{Br}^-$		
LM 26.1	$=\text{O}$		

4.4.3 Struktur-Wirkungsbeziehungen

Besonders auffällig ist, dass die Ketofunktion in β -Position zum Imidazol-Stickstoff für die inhibitorische Aktivität essentiell zu sein scheint. Alle getesteten Substanzen, die diese funktionelle Gruppe nicht besitzen (z.B. LM 23.0, LM 23.2, LM 23.3) waren inaktiv. Mögliche Gründe hierfür wären, dass entweder eine Wasserstoffbrücken-Akzeptorstruktur über den Sauerstoff für die Funktion benötigt wird oder ein sp^2 -hybridisierter Kohlenstoff und damit ein anderer Winkel als die entsprechende sp^3 -hybridisierte Struktur. Während sp^3 -hybridisierte Kohlenstoffe einen Winkel von ca. 109° und eine tetraedrische Form besitzen, hat ein sp^2 -hybridisierter Kohlenstoff einen Winkel von ca. 120° , dessen abgehenden Bindungen sich in einer Ebene befinden. Ein weiterer Hinweis, dass der Bindungswinkel eine entscheidende Rolle für die Aktivität zumindest bei MRP2 besitzt, beschreibt die Arbeitsgruppe um Lai et al., die die Winkel an Biphenyl-substituierten-Heterocyclen variierten und einen Zusammenhang zwischen Aktivität und der Planarität der Struktur zeigen konnten [131]. Des Weiteren scheint auch der Guanidinstickstoff der Imidazolstruktur für die Wirkung benötigt zu werden. Das getestete Harnstoff-Derivat (LM 26.6) zeigte keine inhibitorische Aktivität an den beiden MRPs. Das dem Guanidin-Analogon des LM 26.6 strukturell verwandteste Derivat LM 20.0 zeigte nur schwache Aktivität. Daraus kann geschlossen werden, dass die Harnstoff-Verbindungen zumindest eine deutlich schlechtere Aktivität besitzen als die mit Guanidin-Partialstruktur. Eine Erklärung für die Unwirksamkeit der Harnstoff-Derivate könnte sein, dass diese im Gegensatz zu den Guanidin-Verbindungen bei physiologischem pH-Wert nicht protoniert werden können. Das Fehlen dieser positiven Ladung kann eine Modulator-Protein-Interaktion mit einer anionischen Aminosäurefunktion (z.B. Glutamat- oder Aspartatresten) verhindern, die für die Bindung nötig sein könnte. Eine andere mögliche Ursache für die verschlechterte Wirksamkeit der Harnstoffe könnte sein, dass eine H-Donor-Funktion benötigt wird. Während Guanidin diese besitzt, kann der entsprechende Harnstoff keine Wechselwirkungen mit einem H-Akzeptor ausbilden.

Elektronenziehende Substituenten an den Aromaten, besonders große wie Nitro- oder Cyanogruppen (LM 20.1 und LM 20.3), aber auch kleinere wie Chlor oder Fluor (z.B. LM 20.10; LM 20.12, LM 20.13) haben einen negativen Effekt auf die inhibitorische Wirkung. Im Fall von voluminösen Substituenten (Nitro- und Cyanogruppe) kann dies sowohl sterische als auch elektrostatische Ursachen haben. Der Aktivitätsverlust der fluor- bzw. chlosubstituierten

Aromaten scheint andere Gründe zu haben, da für beide auch aktive Substanzbeispiele gefunden werden konnten. LM 20.9 besitzt einen chloresubstituierten Pyridinrest. Pyridin ist ein sogenannter „Elektronenmangelaromat“, der die elektronenziehende Wirkung des Chloresubstituenten eventuell kompensieren kann.

LM 20.11 besitzt ebenso wie LM 20.10, LM 20.12 und LM 20.13 einen in meta- und para-Position mit Fluor substituierten Aromaten. Nur für LM 20.11 konnte eine IC_{50} bestimmt werden, während alle anderen fluorsubstituierten Aromaten aus bislang ungeklärten Ursachen toxische Eigenschaften aufwiesen. Eine mögliche Ursache könnte die durch die Einführung der Chlor- bzw. Fluorsubstituenten bedingte Erhöhung der Lipophilie und die dadurch hervorgerufene Verschlechterung der Löslichkeit im Puffer sein. Durch Präzipitation im KHP könnte es zur Kristallbildung und dadurch zum Abtöten der Zellen kommen. Ähnlich wird es mit sehr voluminösen Resten wie z.B. in LM 20.15 sein, die ebenfalls eine erhöhte Lipophilie aufweisen. Allerdings könnte bei diesen Substanzen auch sterische Hinderung ein Grund für den Wirkverlust darstellen.

Mit größeren Aromaten an R_1 bei gleichbleibenden R_2 nimmt die Aktivität an MRP1 und MRP2 zu. Vom Methylallyl-Rest (LM 20.2, unwirksam), über einen Cyclohexylmethyl-Rest (LM 20.3; $IC_{50} (MRP1) = 301,0 \mu\text{mol/l}$ / $IC_{50} (MRP2) = \text{unwirksam}$), einen Benzyl-Rest (LM 13.0; $IC_{50} (MRP1) = 35,16 \mu\text{mol/l}$ / $IC_{50} (MRP2) = 69,85 \mu\text{mol/l}$) und einen 3-Phenylpropyl-Rest (LM 20.1, $IC_{50} (MRP1) = 17,19 \mu\text{mol/l}$ / $IC_{50} (MRP2) = 19,89 \mu\text{mol/l}$) bis hin zum Naphthalen-1-ylmethylrest (LM 20.4, $IC_{50} (MRP1) = 6,151 \mu\text{mol/l}$ / $IC_{50} (MRP2) = 10,33 \mu\text{mol/l}$) steigt die Aktivität bis um den Faktor 49 im Fall von MRP1 (LM 20.3/ LM 20.4) an. Die einzige Ausnahme bildet LM 20.0, dessen Phenylethyl-Rest eine Verschlechterung der inhibitorischen Aktivität hervorruft. Eine mögliche Ursache hierfür wird im nächsten Kapitel der 3D-Quantitativen-Struktur-Wirkungsbeziehung (QSAR) diskutiert (Vergl. Kapitel 4.5.2).

Ebenfalls untersucht wurde der Zusammenhang zwischen der Lipophilie, charakterisiert durch den log P-Wert, und den Aktivitätsdaten der Verbindungen [132, 133]. Da die Imidazol-Struktur in allen Verbindungen ungefähr die gleichen basischen Eigenschaften besitzt, kann auf die Berechnung des log D-Wertes, der die Protonierung mit einrechnet, verzichtet werden. Die Werte wurden mit Hilfe von ACD-Labs/LogD, Version 5.16 berechnet. In Abbildung 36 ist die Korrelation der Datensätze wiedergegeben. Der Bestimmtheitsmaß R^2 beträgt zwar nur 0,569, dennoch ist die Korrelation nach Pearson hochsignifikant ($p = 0,0005$).

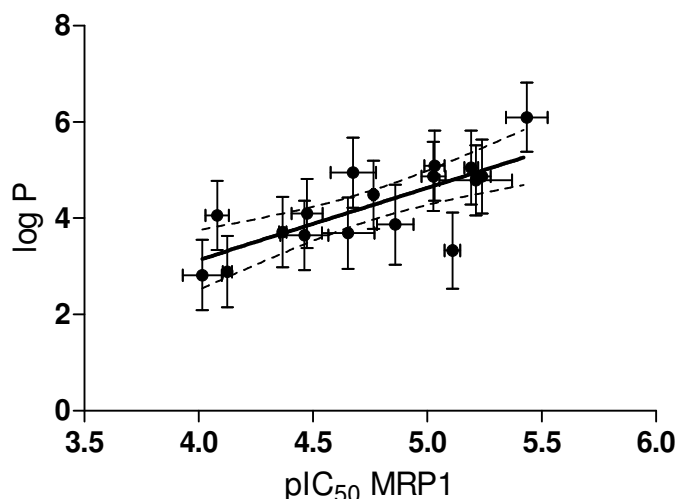


Abbildung 36: Korrelation der errechneten log P-Werte gegen die Aktivitätsdaten. Es besteht ein nach Pearson hochsignifikanter ($p=0,0005$) Zusammenhang zwischen den log P-Werten und den pIC_{50} -Werten, $R^2=0,569$.

Werden bezüglich der Größe und Lipophilie die Reste an R_2 betrachtet, zeigt sich, dass auch hier mit einem großen aromatischen System der inhibitorische Effekt zunimmt, jedoch ist dieser Effekt nicht so deutlich ausgeprägt wie für R_1 beschrieben. Bei einer Vergrößerung der Reste von einem Phenyl- (LM 20.4) auf einen Naphthylrest (LM 20.5) halbiert sich der IC_{50} -Wert ungefähr, sowohl bei MRP1 als auch bei MRP2.

Interessant ist auch, dass sich an R_2 mit Methoxygruppen substituierte Phenylreste besonders in para-Position substituierte Phenylreste als Verschlechterung erweisen. So ist LM 20.8 ($IC_{50} (MRP1)= 21,45 \mu\text{mol/l}$ / $IC_{50} (MRP2)= 45,18 \mu\text{mol/l}$), deutlich weniger inhibitorisch wirksam als die entsprechenden ortho- bzw. meta-substituierten Derivate LM 20.14 ($IC_{50} (MRP1)= 9,328 \mu\text{mol/l}$ / $IC_{50} (MRP2)= 15,50 \mu\text{mol/l}$) und LM 20.17 ($IC_{50} (MRP1)= 6,430 \mu\text{mol/l}$ / $IC_{50} (MRP2)= 9,764 \mu\text{mol/l}$). LM 20.14 und LM 20.17 sind trotz erhöhter Lipophilie allerdings nicht besser wirksam als das entsprechende am Phenylrest unsubstituierte Derivat LM 20.4 ($IC_{50} (MRP1)= 6,151 \mu\text{mol/l}$ / $IC_{50} (MRP2)= 10,33 \mu\text{mol/l}$). Daraus lässt sich schließen, dass eine Volumenzunahme an dieser Position für die Aktivität nicht vorteilhaft ist und planare Verbindungen bevorzugt werden. Unterstützt wird diese These durch das Verhalten von LM 20.7 ($IC_{50} (MRP1)= 22,18 \mu\text{mol/l}$ / $IC_{50} (MRP2)= 36,03 \mu\text{mol/l}$), bei der die inhibitorische Wirkung durch Austausch des para-substituierten Phenylrestes an R_2 durch einen planaren Naphthylrest (LM 20.16 $IC_{50} (MRP1)= 6,405 \mu\text{mol/l}$ / $IC_{50} (MRP2)= 14,67 \mu\text{mol/l}$) deutlich erhöht werden kann. Die Lipophilie stellt also eine mögliche Begründung für die Aktivitätszunahme an den MRPs dar, während die räumliche Ausdehnung an R_2 eine mögliche Ursache für einen Aktivitätsverlust ist. Dass die Lipophilie eine Rolle für

die Aktivitätszunahme spielt, zeigen zumindest Untersuchungen an P-gp, die einen Angriff von innerhalb der Membran als einen der wesentlichen Schritte der Interaktion zwischen Protein und Modulator annehmen. Bei der Interaktion zwischen Modulator und Membran gilt die Lipophilie als eine der entscheidenden Ursachen [134]. Weitere Begründungen werden in Kapitel 4.5.2 diskutiert. In Abbildung 37 werden die erhaltenen Ergebnisse der Struktur-Wirkungsbeziehung graphisch wiedergegeben.

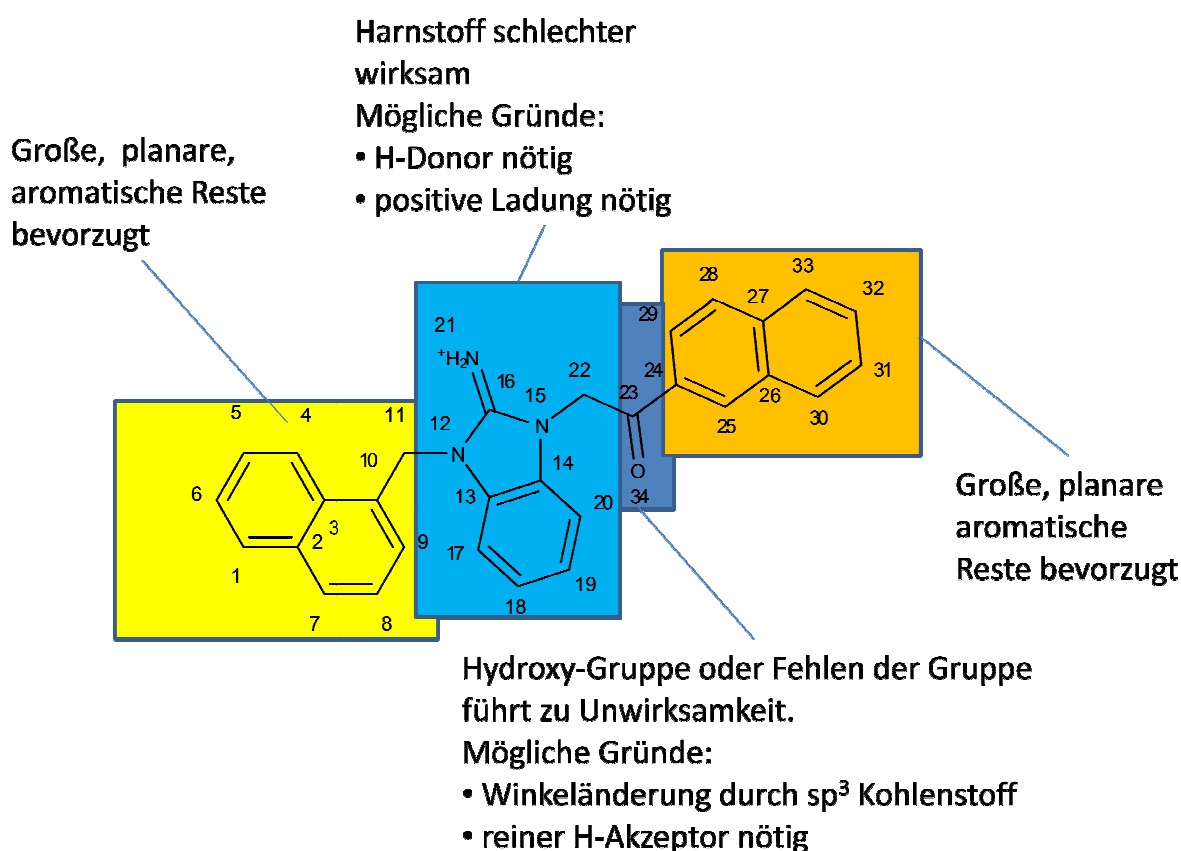


Abbildung 37: Graphische Zusammenfassung der erhaltenen Struktur-Wirkungsbeziehungen für die LM-Verbindungen.

Beim Vergleich der Hill-Koeffizienten zwischen den einzelnen Verbindungen fällt besonders für MRP1 auf, dass es bei größeren Substituenten an R_1 zu einer Erhöhung des Hill-Koeffizienten kommt. Der Hill-Koeffizient ist ein Maß für die Kooperativität und kann Hinweise auf die Anzahl interagierender Bindungsstellen geben [135]. Das würde für die LM-Verbindungen bedeuten, dass die Verbindungen, die einen Hill-Koeffizienten um zwei besitzen, eventuell mit zwei Bindungsstellen interagieren können. Unterstützt wird diese Annahme

dadurch, dass besonders an R_1 mit großen Resten (z.B. Naphthyl) substituierte Verbindungen wie in LM 20.5, LM 20.4, LM 20.8, LM 20.17 eine Erhöhung des Hill-Koeffizienten bei MRP1 hervorrufen, während kleinere Substituenten (z.B. Phenyl) wie in LM 13.0, LM 13.2, LM 13.6 dies nicht zeigen. Bei MRP2 scheint dieser Effekt keine Rolle zu spielen. Bei MRP2 werden für alle Verbindungen Hill-Koeffizienten größer als eins gemessen (siehe auch Kapitel 4.11.2). Beiden Proteinen gemein ist aber, dass längere Alkyl linker an R_1 wie in LM 20.0 und LM 20.1 nochmals zu einer Erhöhung des Hill-Koeffizienten führen. Eine mögliche Ursache könnte die erhöhte Flexibilität der Verbindungen durch die verlängerte Alkylkette sein. Für P-gp treffen die für MRP1 gezogenen Schlussfolgerungen für den Hill-Koeffizienten im Wesentlichen auch zu, jedoch scheint es bei P-gp, dass ein großer Rest sowohl an R_1 als auch an R_2 für eine Erhöhung des Hill-Koeffizienten z.B. in LM 20.17, LM 20.18, LM 20.9 (vergl. Tabelle 32) nötig ist. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es auch in den Calcein-AM basierten Assays messbare, wahrscheinlich strukturelle Unterschiede in den Proteinen auch zwischen MRP1 und MRP2 gibt.

4.4.4 Inhibitorische Aktivität gegenüber P-gp

Neben der MRP-inhibierenden Wirkung wurden die LM-Verbindungen auch auf ihre biologische Aktivität an P-gp untersucht. Aufgrund ihrer Herkunft (QB-Derivate) und ihrer positiven Ladung konnte davon ausgegangen werden, dass die LM-Verbindungen auch eine modulatorische Aktivität an P-gp zeigen würden. Verwendet wurde der Calcein-AM-Assay für P-gp [95]. Als Standard wurde Verapamil verwendet [95]. In Tabelle 32 sind die biologischen Aktivitäten an P-gp aufgelistet. An dieser Stelle sollen besonders die Unterschiede zwischen den Aktivitätsdaten der MRPs gegenüber P-gp diskutiert und erläutert werden. In Abbildung 38 ist exemplarisch eine Dosis-Wirkungskurve von LM 20.17, dem besten P-gp-Inhibitor aus dieser Testreihe, dargestellt. Auch hier zeigt sich der typische sigmoidale Kurvenverlauf in der selektierten A2780 ADR Zelllinie, während der Kurvenverlauf im Wildtyp relativ unverändert bleibt.

Bei der Betrachtung der Aktivitätsdaten von P-gp zeigt sich, dass sie sich in einem wesentlich engeren Rahmen bewegen, als im Fall von MRP1. So liegen alle Aktivitätsdaten an P-gp im einstelligen mikromolaren Bereich, während sie sich bei MRP1 ca. zwischen 300 und 3 mikromolar bewegen. Ähnlich verhält es sich bei MRP2.

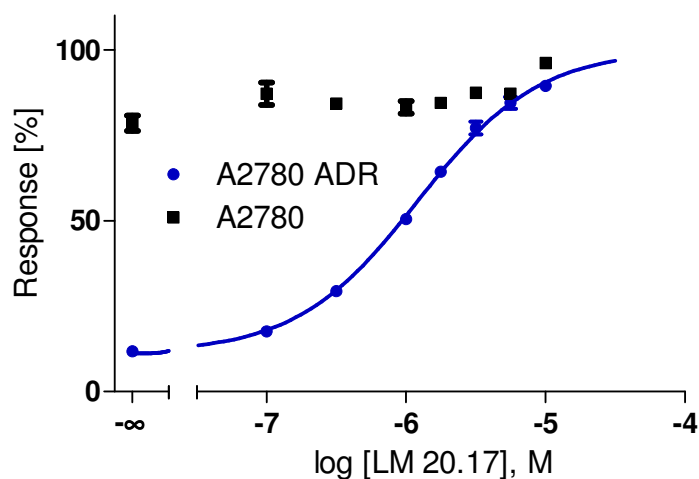


Abbildung 38: Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve von LM 20.17 an P-gp in A2780 ADR und A2780 WT Zellen. Dargestellt ist die Dosis-Wirkungskurve eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Tabelle 32: Biologische Aktivität der LM-Verbindungen an P-gp.

Name	IC ₅₀ [μ mol/l] pIC ₅₀	Hill-Koeffizient
LM 13.0	7,490 \pm 0,563	1
	5,126 \pm 0,032	
LM 13.1	6,639 \pm 0,955	1
	5,181 \pm 0,064	
LM 13.2	5,438 \pm 0,840	1
	5,268 \pm 0,066	
LM 13.3	6,107 \pm 0,907	1
	5,217 \pm 0,063	
LM 13.6	7,505 \pm 1,218	1
	5,129 \pm 0,073	
LM 13.10	2,483 \pm 0,738	1
	5,619 \pm 0,137	
LM 20.0	4,400 \pm 0,036	1
	5,269 \pm 0,150	
LM 20.1	3,489 \pm 0,233	1
	5,458 \pm 0,029	
LM 20.2	91,49 \pm 1,16	1
	4,039 \pm 0,005	
LM 20.3	3,214 \pm 0,498	1
	5,464 \pm 0,068	
LM 20.4	3,558 \pm 0,976	1
	5,454 \pm 0,084	
LM 20.5	1,842 \pm 0,196	2,907 \pm 0,308
	5,736 \pm 0,045	

Name	IC ₅₀ [μ mol/l] pIC ₅₀	Hill-Koeffizient
LM 20.6	6,383 \pm 1,134	1
	5,199 \pm 0,074	
LM 20.7	9,045 \pm 0,169	2,202 \pm 0,842
	5,048 \pm 0,078	
LM 20.8	5,450 \pm 1,288	3,541 \pm 0402
	5,272 \pm 0,106	
LM 20.9	6,476 \pm 0,529	1,557 \pm 0,452
	5,190 \pm 0,035	
LM20.10	6,046 \pm 0,848	1
	5,221 \pm 0,060	
LM 20.11	3,805 \pm 0,925	2,651 \pm 1,048
	5,428 \pm 0,104	
LM 20.14	1,240 \pm 0,195	1
	5,909 \pm 0,067	
LM 20.16	3,046 \pm 0,802	1,553 \pm 0,232
	5,527 \pm 0,122	
LM 20.17	1,248 \pm 0,061	2,011 \pm 0,835
	5,904 \pm 0,021	
LM 20.18	1,400 \pm 0,202	2,070 \pm 1,286
	5,854 \pm 0,064	
LM 24.4	2,685 \pm 0,178	1
	5,571 \pm 0,029	

Zum Vergleich wurden zunächst die Aktivitätsdaten von MRP1 aus Abbildung 35 gegen die entsprechenden Werte für P-gp aufgetragen (Vergl. Abbildung 39). Auch hier besteht eine Korrelation zwischen den beiden Proteinen, die aber im Vergleich zu der entsprechenden von MRP1 und MRP2 deutlich schlechter ausfällt ($R^2_{(\text{MRP2/MRP1})} = 0,949$; $R^2_{(\text{P-gp/MRP1})} = 0,386$). Dennoch besteht ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Datensätzen mit einem $p < 0,005$. Nach dem Ausreißer-Test von Grubbs ist LM 20.3 ein signifikanter Ausreißer (vergl. Kapitel 3.17.4). Wird diese Verbindung aus der Korrelation entfernt erhöht sich das Bestimmtheitsmaß R^2 auf 0,571. Was auf eine Sonderrolle von LM 20.3 in dieser Reihe der LM-Verbindungen hinweist.

In der Korrelation fällt auf, dass einige Verbindungen an P-gp einen deutlich höheren pIC₅₀-Wert besitzen als an MRP1. Darunter sind vor allem an R₂ in meta oder ortho Position substituierte Aromaten (z.B. LM 13.10, LM 20.18, LM 20.17). Daraus lässt sich ableiten, dass größere Substituenten in ortho, bzw. meta-Position die Inhibition an P-gp begünstigen. Im Gegenzug

sind para- und unsubstituierte Verbindungen leicht benachteiligt (z.B. LM 20.4, LM 20.7, LM 13.0).

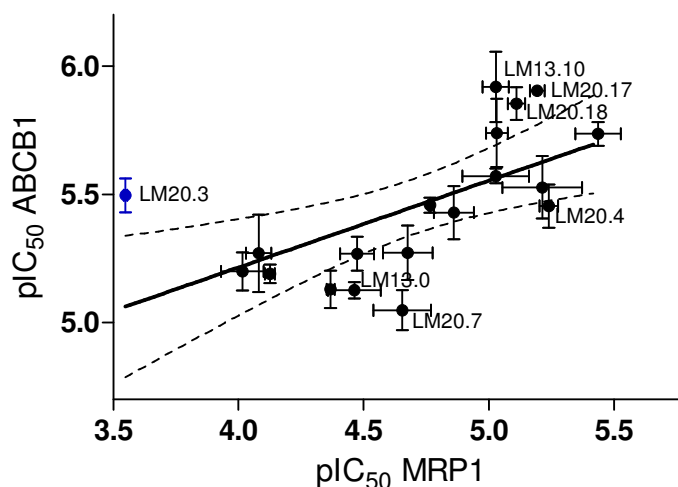


Abbildung 39: Korrelation der Aktivitätsdaten zwischen MRP1 und P-gp nach Pearson. Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0,386. Beim Weglassen von LM 20.3 aus der Korrelation erhöht sich das Bestimmtheitsmaß auf 0,571. LM 20.3 (blau) ist ein signifikanter Ausreißer ($p < 0,05$).

Ein solcher Zusammenhang lässt sich für R_1 nicht ausmachen, jedoch fällt die Substanz LM 20.3, die an R_1 einen Cyclohexyl-Rest besitzt, auf. Während bei MRP2 keine messbare und bei MRP1 eine sehr schwache inhibitorische Aktivität festgestellt werden konnte ($IC_{50} = 301,0 \mu\text{mol/l}$), besitzt LM 20.3 an P-gp eine mit einem IC_{50} von $3,21 \mu\text{mol/l}$ im Vergleich sehr gute Aktivität. MRP1 und MRP2 bevorzugen anscheinend flache, planare aromatische Substituenten an dieser Stelle, während P-gp offenbar auch voluminösere Reste akzeptiert. Um diese Annahme zu untermauern, müssten weitere Substanzen mit ähnlichen Partialstrukturen an R_1 untersucht werden.

Werden die gemessenen pIC_{50} -Werte mit den errechneten log P-Werte verglichen, so ergibt sich die in Abbildung 40 dargestellte Korrelation.

Wie schon bei den MRPs ergibt sich hier ein relativ schlechter Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,338. Dennoch liegt die Wahrscheinlichkeit, dass die Daten nicht korrelieren, nach Pearson bei $p=0,014$. Ein Zusammenhang zwischen der Lipophilie und den Aktivitätsdaten ist offensichtlich, jedoch ist dieser nicht so deutlich ausgeprägt, wie z.B. bei MRP1. Es muss also noch andere Ursachen, wie z.B. die räumliche Ausdehnung (Vergl. auch Kapitel 4.5.2) geben, die eine Rolle für die Wirksamkeit der LM-Verbindungen an P-gp spielen.

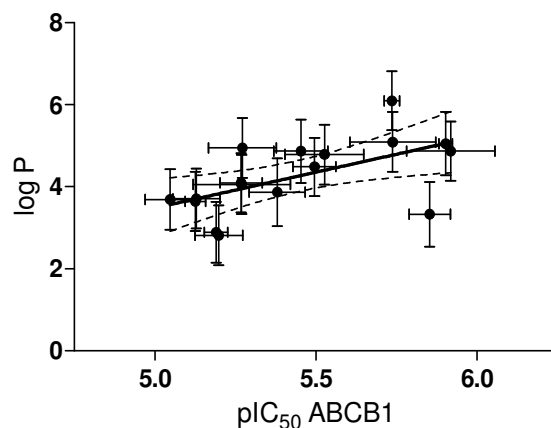


Abbildung 40: Korrelation der Aktivitätsdaten für P-gp gegen die errechneten log P-Werte. Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,338$.

4.5 Dreidimensionale quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (3D-QSAR) der LM-Verbindungen

Die hier gezeigten Daten und Bilder aus der dreidimensionalen quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehung (3D-QSAR) wurden in Zusammenarbeit mit L. Möllmann aus denen in dieser Arbeit erhobenen biologischen Daten erstellt. An dieser Stelle soll nur ein kurzer Einblick in die 3D-QSAR gegeben werden und die Ergebnisse mit denen aus den qualitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen verglichen werden.

Es wurden zwei verschiedene Verfahren zur Analyse der 3D-QSAR angewendet. Bei diesen handelt es sich zum einem um die von Cramer et al. [136] entwickelte vergleichende Molekülfeldanalyse (Comparative Molecular Field Analyse = CoMFA) und zum anderen um die von Klebe et al. entworfenen Vergleich molekularer Ähnlichkeits-Indizes (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis = CoMSIA) [137].

Zunächst wurde ein Pharmakophormodell erstellt, dazu wurden die Substanzen so ausgerichtet, dass sie möglichst der biologisch aktiven Konformation entsprechen und dann überlagert. Da die Konformation nicht bekannt ist, wurde eine Verbindung ausgewählt (LM 13.0) und deren energieärmste Form als Leitstruktur verwendet. Für die 3D-QSAR ist dieses Überlagerungsverfahren essentiell, da hierbei Molekülfelder an gleichen räumlichen Punkten verglichen werden. Die überlagerten Strukturen werden dann einzeln in ein 3D-Gitter eingebracht und die Molekülfelder je nach Methode berechnet. Aus den Molekülfeldern werden dann mit dem Partial Least Squares (PLS-)Verfahren die Variablen herausgefiltert, die wichtig für die Beschreibung der Unterschiede der biologischen Daten sind.

4.5.1 Berechnung der Molekülfelder und Erstellung des 3D-QSAR-Modells

Wie oben bereits erwähnt wurden die Strukturen in ein 3D-Gitter eingebettet. Dieses Gitter hat eine definierte Maschenweite von 2 Å. Mit Hilfe von Sonden werden an den Schnittpunkten innerhalb dieses Gitters Wechselwirkungsenergien berechnet, die in ihrer Gesamtheit als Molekülfeld bezeichnet werden. Dieses Molekülfeld ist spezifisch für eine Struktur und wird durch die Vielzahl der Wechselwirkungsenergien charakterisiert. Zur Untersuchung von sterischen Effekten wird z.B. ein Kohlenstoffatom als Sonde eingesetzt. Für die Berechnung der sterischen Interaktionsenergien wird das Lennard-Jones-Potential verwendet. Elektrostatische Wechselwirkungen werden hingegen durch ein Coulomb-Potential mit einer einfach positiv geladenen Probe bestimmt. Werden die in Abbildung 41 dargestellten Verläufe des Lennard-Jones-Potentials und des Coulomb-Potentials betrachtet, so zeigt sich, dass mit kleinen Abständen r zwischen Sonde und Molekül die Energien $E(r)$ sehr schnell stark ansteigen. Da dies die Datenanalyse erschweren kann, werden sogenannte Grenzwerte eingeführt.

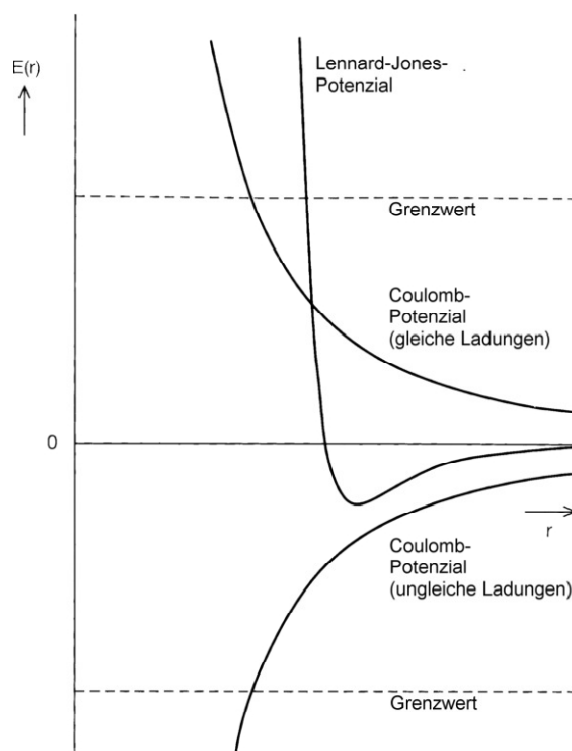


Abbildung 41: Lennard-Jones- und Coulomb-Potential-Verlauf, die zur Beschreibung von zwischenmolekularen Wechselwirkungen in der CoMFA herangezogen werden (nach [138]).

Im Gegensatz zur CoMFA werden bei der CoMSIA keine Wechselwirkungsenergien, sondern relative Ähnlichkeiten zueinander verglichen. In Analogie zur CoMFA werden die Strukturen in ein 3D-Gitter mit einer Maschenweite von 2 Å eingesetzt und mit verschiedenen Sonden die

Moleküleigenschaften ermittelt. Aus diesen Daten können dann mittels einer Gauß-Funktion die Ähnlichkeitsindizes berechnet werden. Im Gegensatz zu den Potentialen besitzt die Gauß-Funktion einen endlichen Verlauf und macht den Einsatz von Grenzwerten unnötig. Des Weiteren hat sie den Vorteil, dass sie gleichmäßiger ansteigt und auch Daten aus den Bereichen innerhalb von Molekülen mit in die Erstellung des Modells einbezogen werden können (siehe auch Abbildung 42).

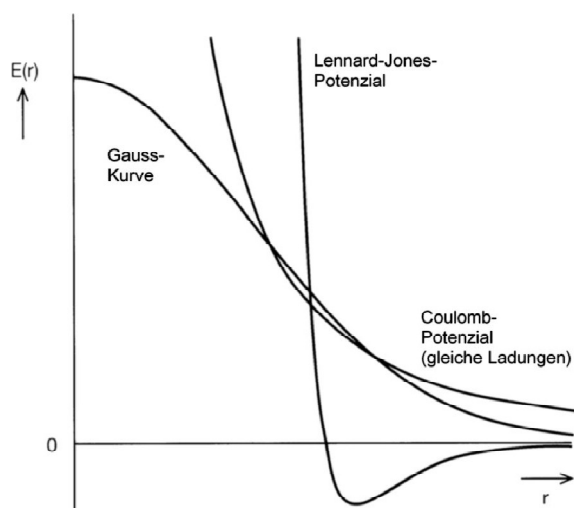


Abbildung 42: Vergleich der in der CoMFA verwendeten Potentiale mit der in der CoMSIA verwendeten Gauß-Kurve (nach [138]).

Sowohl CoMFA als auch CoMSIA liefern als Ergebnis eine Vielzahl an unabhängigen Variablen, denen nur wenige abhängige Variablen gegenüberstehen, die Aktivitätsdaten. Mittels des PLS (partial least squares)-Verfahrens, werden die Anzahl der unabhängigen Variablen reduziert, indem aus den unabhängigen Variablen latente Variablen in Form von Eigenvektoren extrahiert werden. Diese Eigenvektoren stehen orthogonal, d.h. unkorreliert zueinander und beschreiben einen Teil der Varianz der unabhängigen Variablen. Durch das PLS-Verfahren werden die latenten Variablen so ausgesucht, dass sie maximal mit der abhängigen Variable korrelieren [139]. Für die so erhaltenen Korrelationen stehen verschiedene Validierungsmethoden zur Verfügung. Bei der sogenannten Leave-One-Out-Methode (LOO) wird systematisch jede Verbindung einmal aus dem Datensatz entfernt und ein Modell erstellt, mit dem die Aktivität der entfernten Verbindung vorhergesagt wird. Je besser das Modell ist, desto geringer ist die Diskrepanz zwischen vorhergesagtem und tatsächlichem Aktivitätswert. Ein weiteres Verfahren stellt das sogenannte Leave-Many-Out-Verfahren (LMO) dar. Bei diesem werden im Unterschied zur zuvor beschriebenen Methode die Daten zufällig in eine vorge-

gebene Anzahl von Gruppen unterteilt. Jede Gruppe wird einmal entfernt und erneut eine PLS-Analyse basierend auf den restlichen Gruppen durchgeführt. Da die Zusammensetzung der Gruppen Auswirkungen auf das Validierungsergebnis haben kann, wird die Validierung mehrmals durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Die beiden beschriebenen Methoden werden unter dem Oberbegriff, der Kreuzvalidierung zusammengefasst.

Mathematisch lassen sich die Validierungsmethoden wie folgt quantifizieren: Unter Einbeziehung der Anzahl der untersuchten Verbindungen n und der ermittelten Komponenten c lässt sich die Kreuzvalidierte Standardabweichung s_{PRESS} (Standard deviation of Predictive Sum of Squares) beschreiben.

Gleichung 12

$$s_{PRESS} = \sqrt{\frac{\sum (Y_{beobachtet} - Y_{berechnet})^2}{n - c - 1}}$$

Ein weiteres Maß für die Vorhersagekraft eines erstellten Modells stellt der quadrierte Korrelationskoeffizient q^2 der Vorhersage dar, der wie folgt errechnet wird:

Gleichung 13

$$q^2 = 1 - \left(\frac{\sum (Y_{beobachtet} - Y_{berechnet})^2}{\sum (Y_{beobachtet} - \bar{Y})^2} \right)$$

Der quadrierte Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen $-\infty$ und 1 annehmen und charakterisiert die Güte des statistischen Modells. Die Güte eines Modells lässt sich anhand des q^2 wie folgt abschätzen: Ist $q^2 = 0$ ist dies genauso gut wie kein Modell zu haben. Modelle mit $q^2 \leq 0,4$ besitzen eine schlechte Aussagekraft, im Bereich $0,4 < q^2 \leq 0,6$ ist der Wert eines Modelles umstritten und bei einem $q^2 > 0,6$ handelt es sich zumindest unter statistischen Gesichtspunkten um ein gutes Modell [140].

Nach der Validierung eines Modells können sogenannte Konturdiagramme aufgestellt werden, in dem Bereiche mit Gitterpunkten, die für die Erklärung der biologischen Aktivität im Modell wichtig sind, graphisch dargestellt werden.

4.5.2 3D-QSAR-Modelle der LM-Verbindungen

In Abbildung 43 ist das Alignment aller verwendeten LM-Verbindungen auf Grundlage der Verbindung LM 13.0 dargestellt. Da die biologisch aktive Konformation nicht bekannt ist, wurde die Verbindung wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben, nach der Konformationssuche, energie-minimiert und die anderen Substanzen dann über das so entstandene Template gelegt, die Energiefelder berechnet und mit den biologischen Daten verglichen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden nur Verbindungen verwendet, die in allen drei Assays eine inhibitorische Aktivität zeigten.

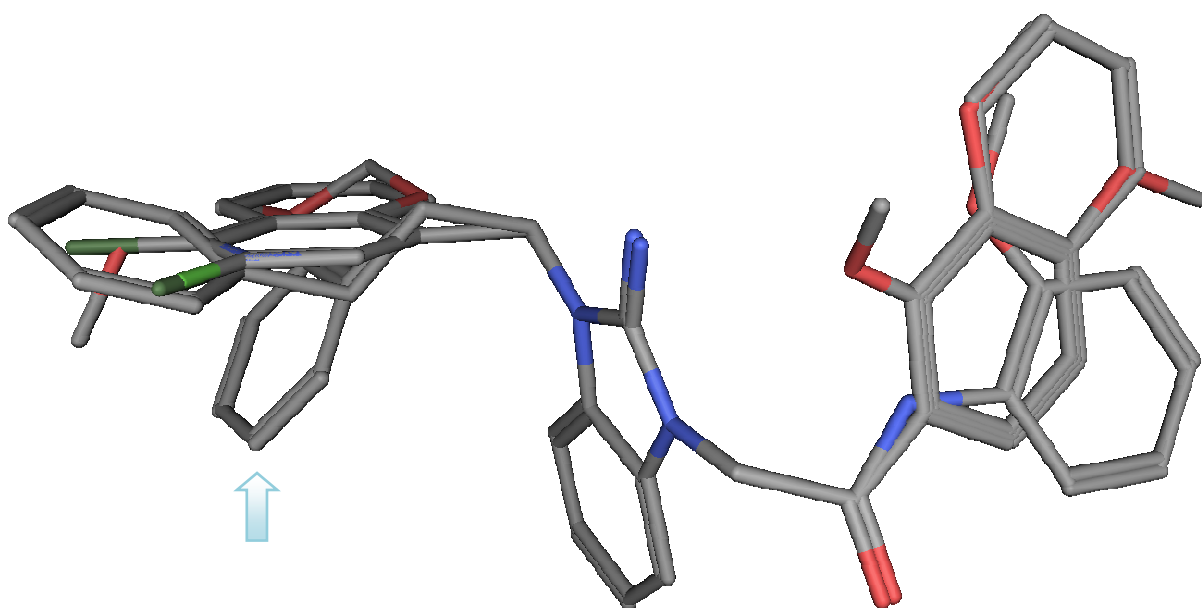


Abbildung 43: Alignment der für die 3D-QSAR verwendeten Strukturen. Aus Übersichtsgründen wurden die Wasserstoffatome weggelassen. Gut zu erkennen ist, dass der Phenylring der Verbindung LM 20.0 deutlich aus der Ebene herausragt (Pfeil).

In Abbildung 43 ist die Überlagerung aller Verbindungen dargestellt. Zu erkennen ist, dass die meisten Verbindungen räumlich etwa in einer Ebene liegen. Die einzige Ausnahme bildet LM 20.0, das aufgrund seines Ethyl-Linkers deutlich aus der Ebene herausragt, was wahrscheinlich die Ursache für die schlechtere inhibitorische Aktivität darstellt.

Auf Basis dieses Alignments wurden mit den entsprechenden Sonden Molekülfelder ermittelt, mit den biologischen Daten mittels PLS-Methode korreliert und zunächst mittels Leave-One-Out (LOO) validiert (Vergl. Kapitel 4.5.1). In Tabelle 33 und Tabelle 34 sind die Ergebnisse für MRP1 und MRP2 zusammengefasst. Werden die Ergebnisse der Modelle für MRP1 und MRP2

verglichen, so ergibt sich, dass für MRP1 grundsätzlich ein besseres Modell vorhergesagt wird. Im Großen und Ganzen zeigt sich aber, dass die Modelle, welche eine gute Vorhersagekraft für MRP1 zeigen, auch für MRP2 gute Ergebnisse erzielen. Dies ist auf die sehr ähnlichen biologischen Daten für MRP1 und MRP2 zurückzuführen (Abbildung 35). Es ergaben sich mehrere, aus statistischer Sicht gute Modelle. Darunter das CoMFA-Modell basierend auf dem sterischen Feld (S) und das entsprechende CoMSIA-Modell. Ein ebenfalls gutes Modell lieferte die auf der Hydrophobie basierende CoMSIA-Modell, jedoch wurden hier sehr viele Komponenten (MRP1: 7 und MRP2: 10 Komponenten) benötigt, sodass dieses nicht verwendet wurde.

Tabelle 33: Ergebnisse der COMFA und COMSIA für MRP1 mit Validierung durch das Leave-One-Out (LOO) Verfahren und ohne Validierung.

MRP1				
	LOO		ohne Validierung	
Felder	q²	Komponenten	R²	StAbw.
CoMFA				
Sterisch (S)	0,660	4	0,952	0,108
Elektrostatisch (E)	0,287	1		
Sterisch + Elektrostatistisch (S + E)	0,635	15		
CoMSIA				
Sterisch	0,767	3	0,906	0,146
Elektrostatisch	0,452	6		
Hydrophob (H)	0,775	7	0,968	0,101
H-Akzeptor (A)	0,238	2		
H-Donator (D)	-0,155	1		
Sterisch + Elektrostatistisch (S + E)	0,697	6		
Sterisch + Hydrophob (S + H)	0,776	3	0,954	0,102
Sterisch + Hydrophob + Elektrostatistisch (S + H + E)	0,825	13	1,000	0,018
H-Donor + Akzeptor (D + A)	0,231	3		

An dieser Stelle werden die Konturdiagramme der CoMSIA basierend auf dem sterischen Feld für die drei untersuchten Proteine MRP1, MRP2 und P-gp diskutiert (Abbildung 44, Abbildung

46, Abbildung 48). In alle Konturdiagramme wurde zur besseren Vergleichbarkeit LM 20.5 eingebettet. Anhand dieser Struktur sollen die Diagramme diskutiert werden. Wie schon anhand der biologischen Daten zu erwarten war (vergl. Kapitel 4.4.2), sind die Konturdiagramme für MRP1 und MRP2 sehr ähnlich. In Position 31, 5 und 6 von LM 20.5 sind sterisch begünstigte Positionen, an denen eine räumliche Ausdehnung vorteilhaft ist. Hinter Position 33 des LM 20.5 ist ein großer sterisch ungünstiger Bereich, der durch die großen Substituenten an dieser Stelle verursacht ist (z.B. Methoxygruppen oder Methylgruppen). Er könnte auch erklären, warum die mit voluminösen Resten in para-Position substituierten Verbindungen wie z.B. LM 13.1 und LM 13.3 inaktiv waren. Unterhalb von Position 8 befindet sich sowohl bei MRP1 als auch beim Konturdiagramm für MRP2 (wenn auch weniger ausgeprägt) ein gelb dargestellter, sterisch ungünstiger Bereich, der durch LM 20.0 hervorgerufen wurde.

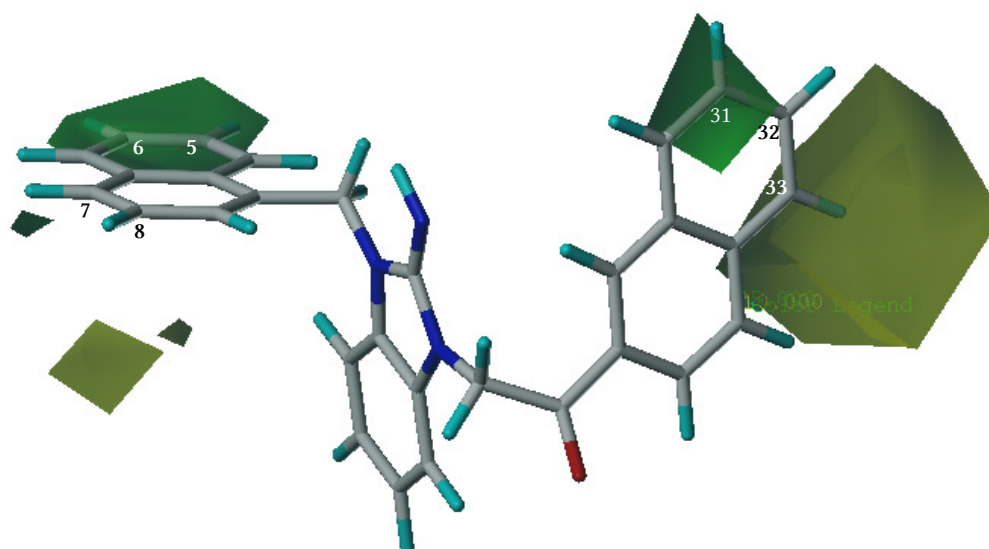


Abbildung 44: Graphische Auswertung des erhalten CoMSIA-Modells auf Basis der sterischen Eigenschaften der Moleküle für MRP1. Gezeigt ist LM 20.5, die beste Testsubstanz im MRP1-Assay. Gelb: Sterisch ungünstig; grün: Sterisch begünstigt.

In Abbildung 45 und Abbildung 47 sind die durch die LOO-Validierungen berechneten pIC_{50} -Werte der jeweiligen weggelassenen Substanzen gegen die entsprechenden gemessenen pIC_{50} -Werte aufgetragen. Für alle Korrelationen wurde ein Ausreißer-Test nach Grubbs durchgeführt [110]. Es wurden keine signifikanten Ausreißer gefunden, sodass die Werte mit den höchsten Abweichungen vom vorhergesagten pIC_{50} -Wert ($> 0,4$ logarithmischen Einheiten) an dieser Stelle diskutiert werden sollen. Die Abbildung 45 und Abbildung 47 demonstrieren, dass die berechneten Werte gut mit den gemessenen Werten übereinstimmen (Bestimmtheitsmaß

$R^2 = 0,701$ (MRP1) bzw. $0,571$ (MRP2)). Werden die einzelnen Werte der Korrelationen genauer verglichen so fällt sowohl für MRP1 als auch für MRP2 auf, dass für beide Proteine zwei Verbindungen gemeinsam, mit Residuen größer als 0,4 logarithmischen Einheiten, aus der Korrelation herausfallen. Dies ist zum einem LM 20.4, für die eine deutlich schlechtere Aktivität vorhergesagt wird und LM 20.6, für die ein deutlich höherer pIC_{50} -Wert vorhergesagt wird. Werden diese Werte aus der Korrelation entfernt, erhöht sich das Bestimmtheitsmaß für MRP1 auf $0,861$ und für MRP2 auf $0,773$. LM 20.6 ist das einzige Derivat mit einem Chlor-Substituenten und Pyridinrest, sodass eventuelle elektrostatische Aspekte ursächlich für die Abweichung sein könnten, die allerdings im sterischen CoMSIA-Modell nicht berücksichtigt werden. Eine Begründung für die schlechte Vorhersage von LM 20.4 könnte dagegen eine mögliche Überbewertung des sterisch begünstigten Bereichs in Position 4 und 5 von LM 20.5 sein (Vergleiche Abbildung 44 und Abbildung 46). Bei MRP2 fällt zusätzlich noch LM 20.1 mit einer Abweichung von mehr als 0,4 logarithmischen Einheiten auf. Ein möglicher Grund wird in der Diskussion der Korrelation für ABCB1 gegeben.

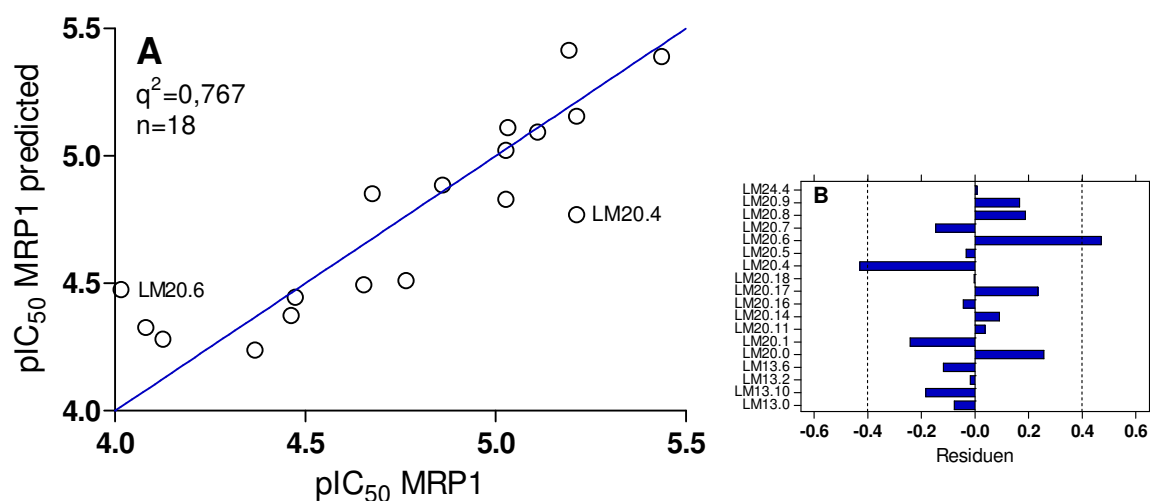


Abbildung 45: A: Korrelation zwischen gemessenen und durch das sterische LOO-CoMSIA-Modell für die entsprechenden Substanzen vorhergesagten pIC_{50} -Werte für MRP1. Die Aktivität der hervorgehobenen Substanzen wich mehr als 0,4 logarithmische Einheiten von den experimentell ermittelten Werten ab. Abbildung B zeigt die als Residuum bezeichnete Differenz zwischen experimentellen und vorhergesagten Werten.

Tabelle 34: Ergebnisse der CoMFA und CoMSIA für MRP2 mit Validierung durch das Leave-One-Out (LOO) Verfahren und ohne Validierung.

MRP2				
	LOO		Ohne Validierung	
Felder	q^2	Komponenten	R^2	StAbw.
CoMFA				
S	0,622	9	0,958	0,144
E	0,248	1		
S + E	0,423	15		
CoMSIA				
S	0,652	3	0,870	0,191
E	0,320	2		
H	0,684	10	0,968	0,133
D	-0,123	1		
A	0,341	2		
S + E	0,620	13		
S + H	0,659	2	0,906	0,157
S + H + E	0,737	10		
D + A	0,335	3		

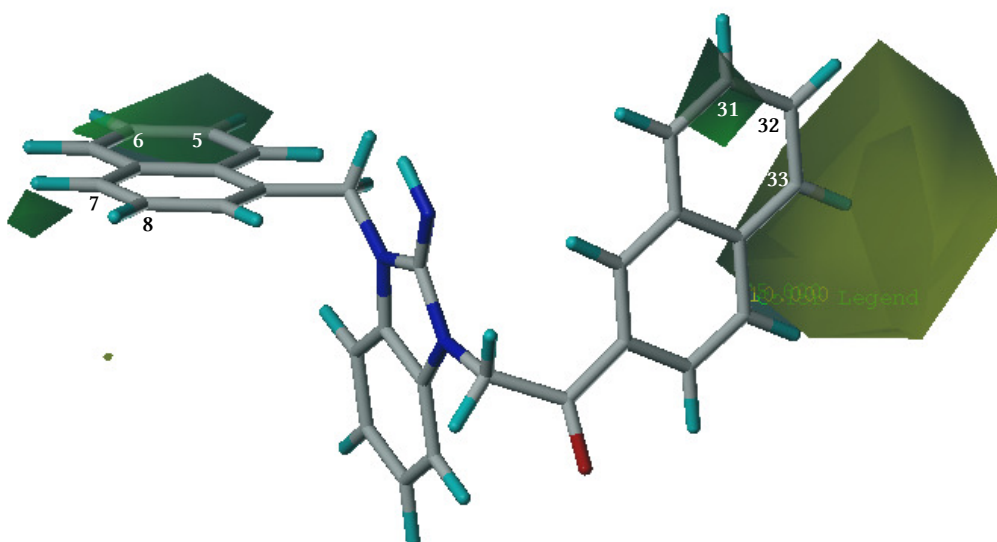


Abbildung 46: Graphische Auswertung des sterischen CoMSIA-Modells auf Basis der sterischen Eigenschaften der Moleküle für MRP2. Gezeigt ist LM 20.5, die beste Testsubstanz im MRP2-Assay. Gelb: Sterisch ungünstig; grün: Sterisch begünstigt.

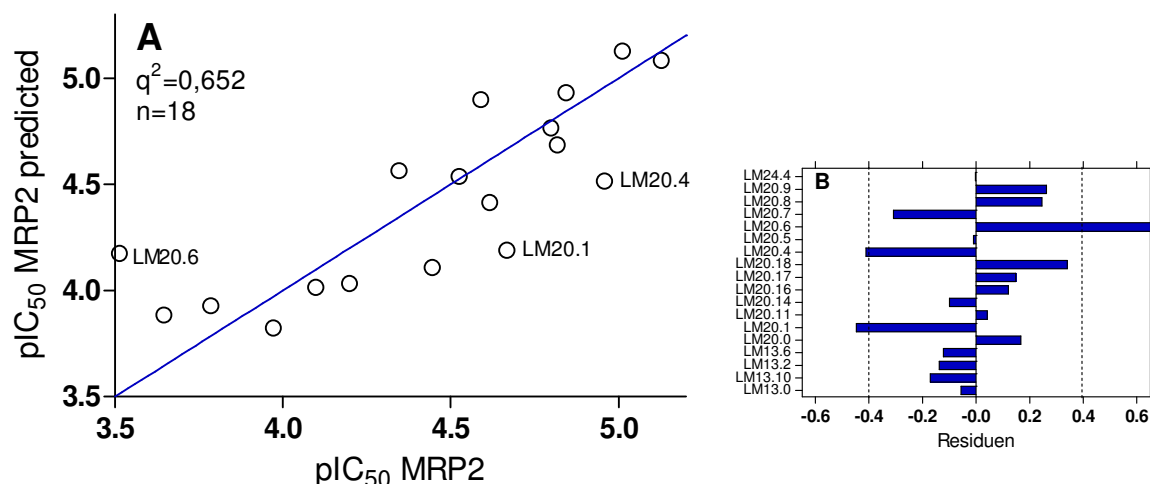


Abbildung 47: Korrelation zwischen gemessenen und durch das sterische LOO-CoMSIA-Modell für die entsprechenden Substanzen vorhergesagten pIC₅₀-Werte für MRP2. Die Aktivität der hervorgehobenen Substanzen wich mehr als 0,4 logarithmische Einheiten von den experimentell ermittelten Werten ab. Abbildung B zeigt die als Residuum bezeichnete Differenz zwischen experimentellen und vorhergesagten Werten.

Die Ergebnisse der CoMFA und CoMSIA-Berechnungen für P-gp mit und ohne LOO-Validierung sind in Tabelle 35 zusammengefasst. Zur besseren Vergleichbarkeit wird auch für P-gp das CoMSIA-Konturdiagramm basierend auf den sterischen Eigenschaften mit denen der MRPs verglichen, obwohl das entsprechende CoMFA-Modell das Modell mit der besten Vorhersagekraft darstellt. Der größte Unterschied zwischen den Modellen der MRPs gegenüber dem von P-gp ist der deutlich größere sterisch begünstigte Bereich in den Positionen 30 und 31 der MRPs (Abbildung 48). Im Fall von P-gp erstreckt sich dieser Bereich noch bis über Position 25 von LM 20.5 und spiegelt die bessere Wirksamkeit der in meta- und para-substituierten Aromaten wider. Auch auffällig ist das Fehlen des sterisch ungünstigen Bereiches unterhalb der Position 8 der LM 20.5, dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass an dieser Stelle auch voluminösere Reste akzeptiert werden. Ein weiterer Hinweis darauf liefert, dass die an dieser Stelle mit einem voluminösen Cyclohexyl substituierte Verbindung LM 20.3 an P-gp deutlich inhibitorisch aktiver ist als an MRP1 und MRP2.

Tabelle 35: Ergebnisse der CoMFA und CoMSIA für P-gp mit Validierung durch das Leave-One-Out (LOO) Verfahren und ohne Validierung.

P-gp				
	LOO		Ohne Validierung	
Felder	q^2	Komponenten	R^2	StAbw.
CoMFA				
S	0,788	2	0,919	0,084
E	0,457	3		
S + E	0,704	4	0,962	0,062
CoMSIA				
S	0,768	3	0,928	0,082
E	0,471	2		
H	0,419	2		
D	-0,019	1		
A	-0,021	1		
S + E	0,638	3		
S + H	0,640	2	0,873	0,105
S + H + E	0,647	3	0,931	0,081
D + A	-0,031	3		

In Abbildung 49 ist die Korrelation der berechneten pIC_{50} -Werte der in der LOO-Validierung jeweils weggelassenen Verbindung gegen die gemessenen Werte aufgetragen. Auch hier zeigt sich eine hohe Korrelation der Werte. Das Bestimmtheitsmaß R^2 beträgt 0,741 und zeigt eine hohe Korrelation der Datensätze. Keine Verbindung weicht mehr als 0,4 logarithmische Einheiten von den experimentell bestimmten Werten ab. Der einzige Datenpunkt, der von der Trendlinie mit mehr als 0,25 logarithmischen Einheiten abweicht, ist LM 20.1 und nicht wie bei MRP1 und MRP2 LM 20.4 und LM 20.6, was nochmals die Unterschiede zwischen den MRPs und P-gp demonstriert. LM 20.1 ist die Verbindung mit dem längsten Alkyl linker zwischen Aromat und der Benzimidazolstruktur und könnte, aufgrund des Fehlens von vergleichbaren Substanzen als schlechter vorhergesagt werden.

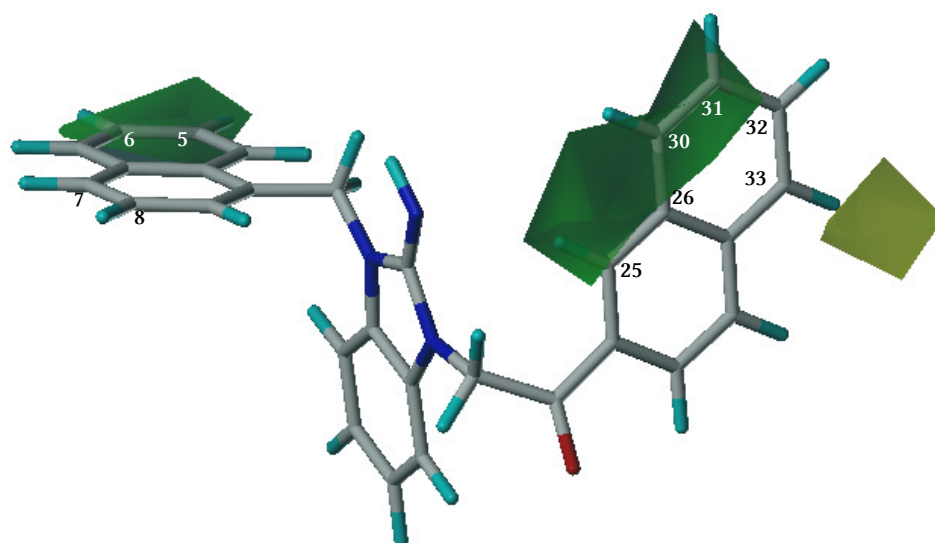


Abbildung 48: Graphische Auswertung des erhalten CoMSIA-Modells auf Basis der sterischen Eigenschaften der Moleküle für P-gp. Gezeigt ist zur besseren Vergleichbarkeit wieder LM 20.5. Gelb: Sterisch ungünstig; grün: Sterisch begünstigt.

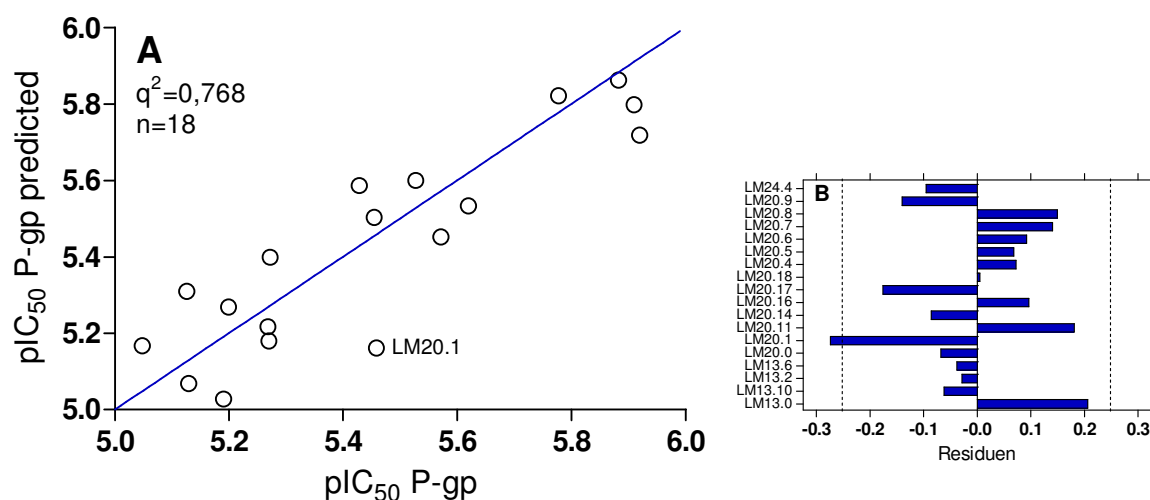


Abbildung 49: A: Korrelation zwischen gemessenen und durch das sterische LOO-CoMSIA-Modell für die entsprechenden Substanzen vorhergesagten pIC_{50} -Werte für P-gp. Keine der Substanzen wich mehr als 0,4 logarithmische Einheiten von den experimentellen Daten ab. Die hervorgehobene Substanz ist die mit der größten Abweichung von den gemessenen pIC_{50} -Werten ($> 0,25$ logarithmischen Einheiten). Abbildung B zeigt die als Residuum bezeichnete Differenz zwischen experimentellen und vorhergesagten Werten.

Zusätzlich zur LOO-Validierung wurde für alle Proteine noch zusätzlich eine Leave-Many-Out (LMO)-Validierung für die besten CoMFA- und CoMSIA-Modelle durchgeführt. Die Ergebnisse der Validierung sind in Tabelle 36 zusammengestellt. Mit Ausnahme des sterischen CoMFA-

Modells für MRP2 kann für die anderen untersuchten Modelle ca. ein Drittel bis die Hälfte der Verbindungen weggelassen werden, bevor es zu einem $q^2 < 0,5$ und damit zu statistisch schlechten Modellen kommt.

Tabelle 36: Ergebnisse der Leave-Many-Out-Validierung der besten 3D-QSAR-Modelle. Jedes q^2 wurde als Mittelwert aus 100 Zyklen berechnet.

Fields	M	LMO					
		MRP1		MRP2		P-gp	
		q^2	SPRESS	q^2	SPRESS	q^2	SPRESS
CoMFA	-						
S	6	0,644	0,061	0,508	0,079	0,764	0,057
	5	0,639	0,069			0,749	0,071
	4	0,633	0,079			0,750	0,048
	3	0,618	0,102			0,716	0,100
	2	0,539	0,148			0,602	0,171
CoMSIA	-						
S	6	0,747	0,034	0,617	0,051	0,722	0,088
	5	0,743	0,041	0,611	0,046	0,711	0,087
	4	0,725	0,050	0,608	0,071	0,706	0,086
	3	0,702	0,070	0,571	0,088	0,689	0,104
	2	0,609	0,139			0,607	0,145
CoMSIA	-						
H	6	0,734	0,048	0,651	0,053		
	5	0,723	0,064	0,634	0,056		
	4	0,689	0,082	0,629	0,073		
	3	0,667	0,114	0,606	0,087		
	2	0,558	0,168	0,532	0,137		
CoMSIA	-						
S+ E	6					0,653	0,080
	5					0,634	0,088
	4					0,617	0,108
	3					0,601	0,139
	2					0,508	0,162

Beim Vergleich der drei CoMSIA-Konturdiagramme, beruhend auf den sterischen Wechselwirkungen der Verbindungen der jeweiligen Proteine miteinander, fällt auf, dass es eine höhere Ähnlichkeit zwischen den Modellen der MRPs gibt als zu dem Modell von P-gp. Wie schon aus den Korrelationen zwischen MRP1 und MRP2 bzw. zwischen MRP1 und P-gp ersichtlich, war

dies auch zu erwarten. Der Grund liegt wahrscheinlich im höheren Verwandtschaftsgrad der MRPs untereinander im Vergleich zu P-gp [3, 141]. Nichtsdestotrotz ähneln sich alle drei Modelle in den meisten Punkten, was schließen lässt, dass die LM-Modulatoren an eine hochkonservierte Domäne der ABC-Transporter binden.

4.6 Gü-Verbindungen als selektive Modulatoren für MRPs

4.6.1 Aufbau der Modulatoren

Die folgenden Verbindungen wurden im Arbeitskreis von Prof. Gütschow synthetisiert. Eine Beschreibung der Synthese wird in der Dissertation von H.-G. Häcker zu finden sein.

Prinzipiell sind die Modulatoren aus einer aromatischen Carbonsäure aufgebaut, die in ortho-Position einen Harnstoff- oder Thioharnstoff-Substituenten tragen. Der N3-Stickstoff des Harnstoffs ist mit verschiedenen Alkylresten substituiert. Teile der Testungsergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Frau Wiendlocha im Rahmen einer Diplomarbeit an der Universität Bonn angefertigt [142]. In Abbildung 50 ist beispielhaft eine Inhibitionskurve von Gü 658, der besten Substanz im Test, dargestellt.

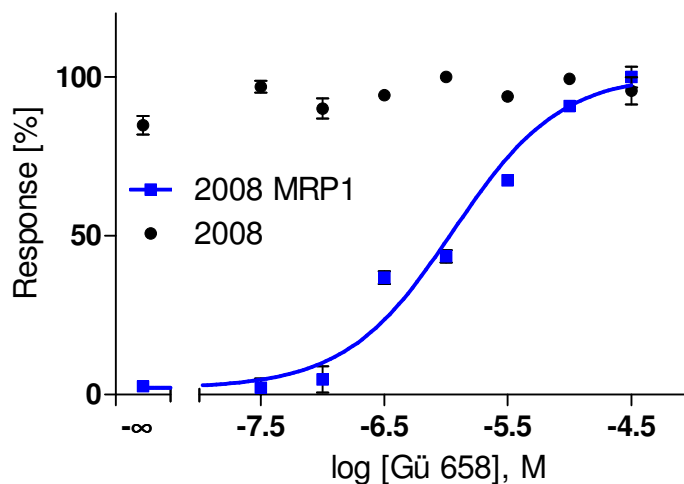


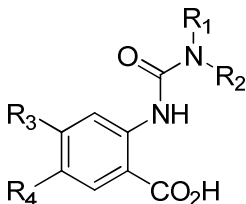
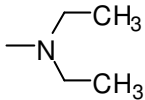
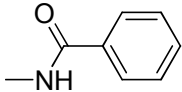
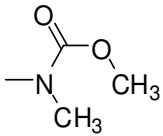
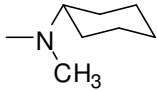
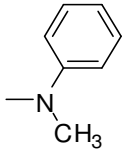
Abbildung 50: Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve von Gü 658 an MRP1 in 2008 MRP1 und WT Zellen. Dargestellt ist eine Dosis-Wirkungskurve eines repräsentativen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

4.6.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen für MRP1

Alle getesteten 2-Ureidobenzoessäuren sind in Tabelle 37 zusammengestellt. Besonders gut inhibitorisch wirksame Verbindungen ergaben sich bei einer Diethylureido- bzw. Cyclohexyl-Methylureido-Teilstruktur (Gü 559, Gü 556, Gü 681, Gü 1541). Wurde diese Teilstruktur durch elektronenziehende Reste wie z.B. Phenyl- oder Benzylreste ausgetauscht, so erfolgte in der Regel ein totaler Wirkverlust (vergl. Gü 319, Tabelle 48 im Anhang).

Das Einfügen eines Methylrestes in Position 5 (R_4 = Methyl), führte zu keiner Verbesserung der biologischen Aktivität. Im Gegensatz dazu verbesserte ein ankondensierter Benzenring die inhibitorische Wirksamkeit drastisch. So ist das Naphthalen-Derivat (Gü 1541) mit einem IC_{50} -Wert von 5,38 $\mu\text{mol/l}$ mit Abstand die inhibitorisch aktivste Verbindung dieser Serie.

Tabelle 37: Strukturformeln und biologische Aktivität aller getesteten 2-Ureidobenzoessäuren.

					
Bezeichnung	NR_1R_2	R_3	R_4	IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$] pIC_{50}	Hill-Koeffizient
Gü 559		—H	—H	$26,41 \pm 10,13$	1
				$4,578 \pm 0,015$	
Gü 556		—H	—H	k. E.	-
Gü 579		—H	—H	k. E.	-
Gü 566		—H	—H	$11,86 \pm 0,31$	1
				$4,937 \pm 0,119$	
Gü 611		—H	—H	k. E.	-

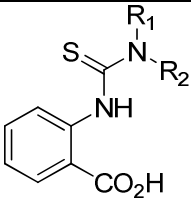
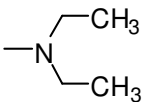
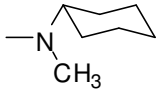
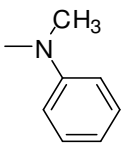
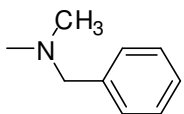
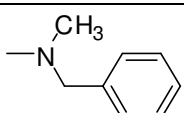
Bezeichnung	NR ₁ R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ [μmol/l] pIC ₅₀	Hill-Koeffizient
Gü 568		—H	—H	38,92 ± 0,33	1
				4,331 ± 0,116	
Gü 604		—H	—H	k. E.	-
Gü 560		—H	—H	43,93 ± 11,12	1
				4,366 ± 0,104	
Gü 410		—H	—H	k. E.	-
Gü 618		—H	—CH ₃	23,39 ± 6,18	1
				4,642 ± 0,121	
Gü 619		—H	—CH ₃	k. E.	-
Gü 623		—H	—CH ₃	k. E.	-
Gü 615		—H	—CH ₃	k. E.	-
Gü 660		—H	—CH ₃	k. E.	-
Gü 587		—CH ₃	—CH ₃	43,38 ± 13,32	1
				4,375 ± 0,125	
Gü 1541				5,382 ± 0,683	1
				5,272 ± 0,057	

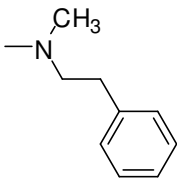

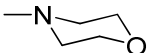
k. E. = kein Effekt

In Tabelle 38 sind Benzoesäuren mit einer Thioharnstoffteilstruktur an Position 2 dargestellt. Ähnlich wie bei den Harnstoffen war auch bei den Thioharnstoffen eine Cyclohexyl-Methyl-Substitution vorteilhaft für die inhibitorische Aktivität (Gü 1525; IC₅₀=16,21 μmol/l). Jedoch waren mit Ausnahme von Gü 1527 und Gü 1521 alle Verbindungen von diesem Typ mit einem

IC₅₀-Wert von ca. 20 µmol/l etwa gleich aktiv. Durch den Austausch der Harnstoffstruktur durch einen Thioharnstoff (vergl. Tabelle 37) verbesserte sich in den meisten Fällen die Aktivität. Beispiele hierfür sind Gü 559 (IC₅₀=26,4 µmol/l) und Gü 1522 (IC₅₀=21,6 µmol/l), Gü 568 (IC₅₀=42,6 µmol/l) und Gü 1522 (IC₅₀=29,1 µmol/l), Gü 611 (nicht aktiv) und Gü 1524 (IC₅₀=24,0 µmol/l). Neben den oben beschriebenen Benzoesäuren wurden noch einige abweichend substituierte Verbindungen mit einer 2-(3-arylthioureido)-Partialstruktur untersucht. Diese waren alle inaktiv (vergl. Tabelle 48 im Anhang). Dies lässt darauf schließen, dass die Stickstofffunktion für die Wirkung essentiell ist, was auf die geringere elektronenziehende Wirkung des Stickstoffes im Vergleich zum Sauerstoff zurückzuführen sein könnte. Des Weiteren führt auch hier ein Austausch der Carbonsäurefunktion durch eine Nitrilgruppe zum Wirkverlust (Gü 1520 im Vergleich zu Gü 378).

Tabelle 38: Strukturformeln und biologische Aktivität aller getesteten Benzoesäuren mit einer Thioharnstoffteilstruktur.

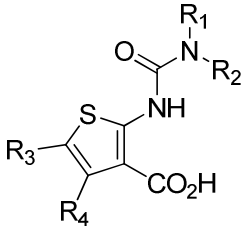
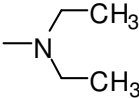


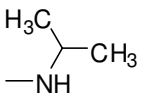


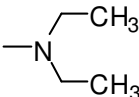


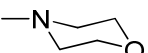


			
Bezeichnung	NR ₁ R ₂	IC ₅₀ [µmol/l] pIC ₅₀	Hill-Koeffizient
Gü 1520		21,65 ± 5,27	1
		4,674 ± 0,110	
Gü 1525		16,21 ± 4,18	1
		4,800 ± 0,113	
Gü 1527		197,8 ± 28,6	1
		3,707 ± 0,064	
Gü 1522		29,10 ± 9,14	1
		4,552 ± 0,149	
Gü 1524		24,02 ± 6,89	1
		4,631 ± 0,121	

Bezeichnung	NR ₁ R ₂	IC ₅₀ [μmol/l] pIC ₅₀	Hill- Koeffizient
Gü 1526		18,31 ± 4,51	1
		4,746 ± 0,104	
Gü 1523		20,66 ± 2,54	1
		4,687 ± 0,053	
Gü 1521		k. E.	-

k. E. = kein Effekt

In Tabelle 39 sind die 2-Ureidothiophen-3-carbonsäuren mit IC₅₀-Werten aufgeführt. Die Morpholin- (Gü 600) und die Dimethyl- (Gü 602) substituierten Verbindungen waren inaktiv, während die beiden Diethylderivate Gü 705 und Gü 601 eine moderate Aktivität an MRP1 zeigten.

Tabelle 39: Strukturformeln und biologische Aktivität aller getesteten 2-Ureidothiophen-3-Carbonsäuren.

					
Bezeichnung	NR ₁ R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ [μmol/l] pIC ₅₀	Hill- Koeffizient
Gü 705				11,89 ± 3,12	1
				4,935 ± 0,116	
Gü 602				k. E.	-
Gü 601				9,029 ± 4,222	1
				5,081 ± 0,229	
Gü 600				k. E.	-

k. E. = kein Effekt

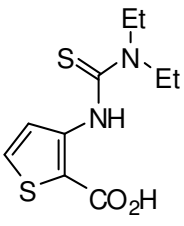
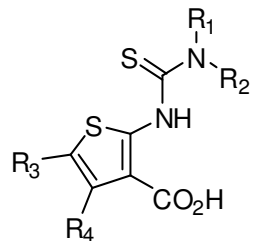
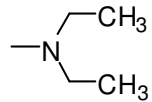
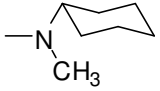
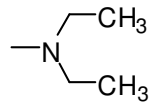
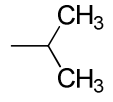
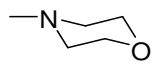
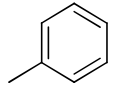
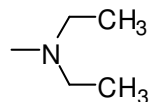
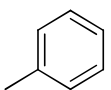
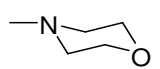
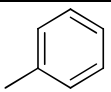
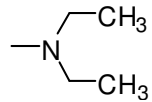
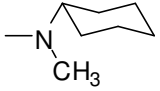
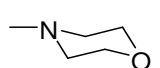
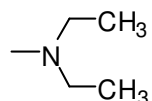
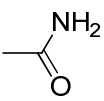
Die beiden Verbindungen besitzen einen vergrößerten, ankondensierten Cycloalkylrest am Thiophen, der sowohl ihre Lipophilie als auch ihre räumliche Ausdehnung erhöht. Bei der Gegenüberstellung mit den Benzoesäuren zeigt sich, dass ihre Aktivitätsdaten zwischen denen der am Ring unsubstituierten Verbindung (Gü 559) und dem Naphthylderivat (Gü 1541) liegen. Neben den vier Thioharnstoffderivaten wurden noch weitere Derivate getestet, die anstelle der Harnstoff- bzw. Thioharnstofffunktion eine 2-Acylamino- bzw. 2-Alkoxycarbonylamino-Gruppe besaßen (Vergl. Tabelle 48 im Anhang). Alle diese Verbindungen waren inaktiv, was mit den elektronenziehenden Eigenschaften der Carbonylfunktion zusammen hängen könnte, da auch Phenylreste zu einem Wirkverlust führten.

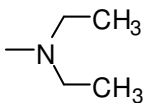

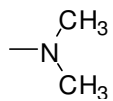

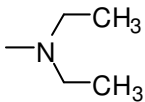

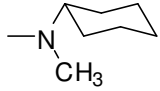

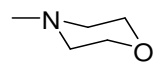

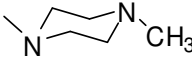

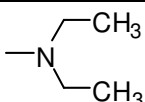
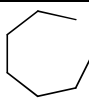
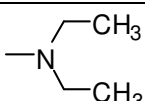

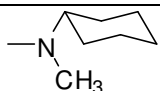

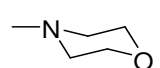

Bei den Thiophenderivaten bildeten die ortho-Thioureidocarbonsäuren die größte Gruppe der untersuchten Substanzen (Tabelle 40). Auch in dieser Gruppe erwies sich die Carbonsäurefunktion als essentiell, da weder Gü 642 der Ester von Gü 647 noch das Cyano-Derivat (Gü 266) von Gü 583 einen inhibitorischen Effekt zeigten. Auch in dieser Gruppe waren diethyl- und cyclohexylmethyl-substituierte Verbindungen (z.B. Gü 658; Gü 1579, Gü 592 etc.) wirksamer als die an dieser Stelle mit polareren Strukturen wie Morpholino oder Methylpiperazin substituierten Verbindungen (z.B. Gü 1518, Gü 74, Gü 97). Da die beiden Isomere Gü 647 und Gü 676 mit IC_{50} -Werten von circa $4\text{ }\mu\text{mol/l}$ etwa gleich aktiv sind, kann daraus geschlossen werden, dass die Position des Schwefels im Thiophenring keinen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität hat.

Ausgehend von Verbindung Gü 676 soll der Einfluss der Substitution in Position 4 und 5 des Thiophenrings diskutiert werden. Durch Einfügen von zwei Methylgruppen in Gü 596 ($IC_{50}=20,4\text{ }\mu\text{mol/l}$) wurde die inhibitorische Aktivität etwas verringert. Ebenso reagierte die mit einem Isopropylrest substituierte Verbindung Gü 686 ($IC_{50}=14,5\text{ }\mu\text{mol/l}$), wohingegen das Einfügen einer polaren Säureamidfunktion in Position 4 (wie in Gü 668) zum totalen Wirkverlust führte.

Eine cyclische Ringerweiterung in Form eines 5 bzw. 6 Ringes (Gü 683 bzw. Gü 583) erhöhte die Aktivität in Vergleich zu Gü 676 leicht, während eine weitere Vergrößerung des ankondensierten Cyclohexylringes in Form einer Methyl-Substitution (Gü 681) bzw. eines 7-Ringes (Gü 681) wieder zur Verschlechterung der Aktivität beitrug.

Tabelle 40: Strukturformeln und biologische Aktivität aller getesteten ortho-Thioureidocarbonsäuren.

<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div>					
Bezeichnung	NR ₁ R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ [μmol/l] pIC ₅₀	Hill-Koeffizient
Gü 647				4,165 ± 0,787	1
				5,386 ± 0,083	
Gü 676		—H	—H	4,487 ± 0,583	1
				5,350 ± 0,055	
Gü 1579		—H	—H	4,519 ± 0,488	1
				5,347 ± 0,049	
Gü 686		—H		14,49 ± 5,52	1
				4,861 ± 0,175	
Gü 1546		—H		k. E.	-
Gü 1544			—H	14,26 ± 4,674	1
				4,864 ± 0,160	
Gü 1545			—H	27,52 ± 3,33	1
				4,562 ± 0,051	
Gü 596		—CH ₃	—CH ₃	26,56 ± 6,39	1
				4,583 ± 0,105	
Gü 592		—CH ₃	—CH ₃	4,191 ± 1,511	1
				5,398 ± 0,105	
Gü 594		—CH ₃	—CH ₃	18,30 ± 4,51	1
				4,747 ± 0,117	
Gü 668			—CH ₃	k. E.	-

Bezeichnung	NR ₁ R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ [μ mol/l] pIC ₅₀	Hill-Koeffizient
Gü 683				2,236 \pm 1,113	1
				5,685 \pm 0,208	
Gü 149				k. E.	-
Gü 583				2,710 \pm 0,351	1
				5,569 \pm 0,057	
Gü 593				k. E.	-
Gü 74				k. E.	-
Gü 97				k. E.	-
Gü 681				10,75 \pm 0,559	1
				5,015 \pm 0,257	
Gü 658				0,932 \pm 0,041	1
				6,030 \pm 0,019	
Gü 1519				1,234 \pm 0,294	1
				5,917 \pm 0,107	
Gü 1518				k. E.	-

k. E. = kein Effekt

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass wahrscheinlich zwei Effekte mit gegensätzlichen Auswirkungen Einfluss auf die Aktivität nehmen. Zum einen die Lipophilie, die eine Aktivitätszunahme bewirkt, zum anderen die sterische Hinderung, die bei zu großer räumlicher Ausdehnung wieder zu einer Wirkverschlechterung bis hin zum Wirkverlust führt. Dies wird auch dadurch deutlich, dass die aktivste Substanz Gü 658 mit einem IC₅₀-Wert von 0,932 μ mol/l durch den ankondensierten Ring sowohl planar ist als auch eine erhöhte Lipophilie besitzt. Obwohl Gü 1544 ebenfalls fast planar sein soll, kommt es zu einem Wirkverlust im Vergleich

zu Gü 658 und den anderen Verbindungen, was durch eine sterische Behinderung durch den großen Phenylrest an R₄ erklärbar ist. Dass eine erhöhte Lipophilie zur Wirksteigerung beiträgt, zeigt auch die Korrelation der pIC₅₀-Werte aller aktiven Substanzen gegen die mittels ACD-Labs 4.3 errechneten log P-Werte (vergl. Abbildung 51). Trotz eines relativ geringen Bestimmtheitsmaßes R^2 von 0,447 führt diese zu einer nach Pearson hochsignifikanten ($p < 0,0001$) Korrelation zwischen Aktivitätsdaten und log P-Werten. Dies lässt zumindest auf eine Tendenz für eine Verbesserung der Aktivität der Gü-Verbindungen durch die Lipophilie schließen, zeigt jedoch auch, dass die Lipophilie nicht der einzige Grund für die Aktivität sein kann.

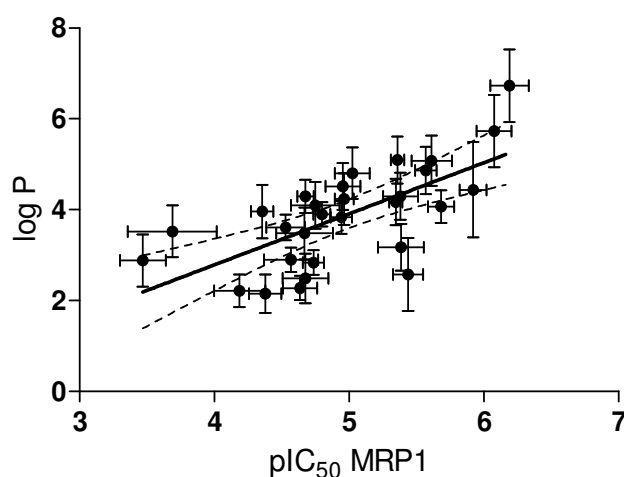


Abbildung 51: Korrelation der gemessenen pIC₅₀-Werte der Gü-Verbindungen und der errechneten log P-Werte. Das Bestimmtheitsmaß R^2 beträgt 0,457.

Beim Vergleich der Harnstoffderivate mit den entsprechenden Thioharnstoffen innerhalb der Gruppe der Thiophene, wird eine leichte Prävalenz für den Austausch des Sauerstoffs gegen ein Schwefelatom deutlich.

Einige der Substanzen wurden zusätzlich im Calcein-AM-Assay auf ihre modulatorischen Eigenschaften an P-gp untersucht (siehe Kapitel 10.8 im Anhang). Die Mehrzahl der untersuchten Substanzen zeigte keine Aktivität bei den gemessenen Konzentrationen. Als einzige Ausnahme sind die großen Verbindungen mit ankondensiertem Phenylring in ortho-Stellung zum Schwefel (Gü 1544 und Gü 1545) zu nennen. Diese zeigen zumindest bei einer Konzentration von 100 µmol/l einen moderaten Effekt. Insgesamt kann gesagt werden, dass die Gü-Verbindungen eine hohe Selektivität für MRP1 besitzen, was wahrscheinlich auf das Vor-

handensein der Carbonsäurefunktion zurückzuführen ist, da P-gp kationische oder ungeladene Substrate bevorzugt [7].

4.6.3 Erstellung eines Pharmakophormodells

Analog zu den im Kapitel 4.5 beschriebenen Verfahren wurde ein Pharmakophormodell für die Gü-Verbindungen erstellt. Als Ausgangsverbindung diente die energieminierte Verbindung Gü 658, welche die aktivste Verbindung darstellte. Über diese Vorlage wurden dann alle aktiven Gü-Verbindungen überlagert und ein Pharmakophormodell anhand der übereinstimmenden Daten berechnet. Die Berechnung erfolgte mittels der Standardeinstellungen von MOE 7.3 (Tolerance: 1,2 und Threshold > 50 %). Das Ergebnis sowohl der Überlagerung als auch der Pharmakophorsuche ist in Abbildung 52 dargestellt.

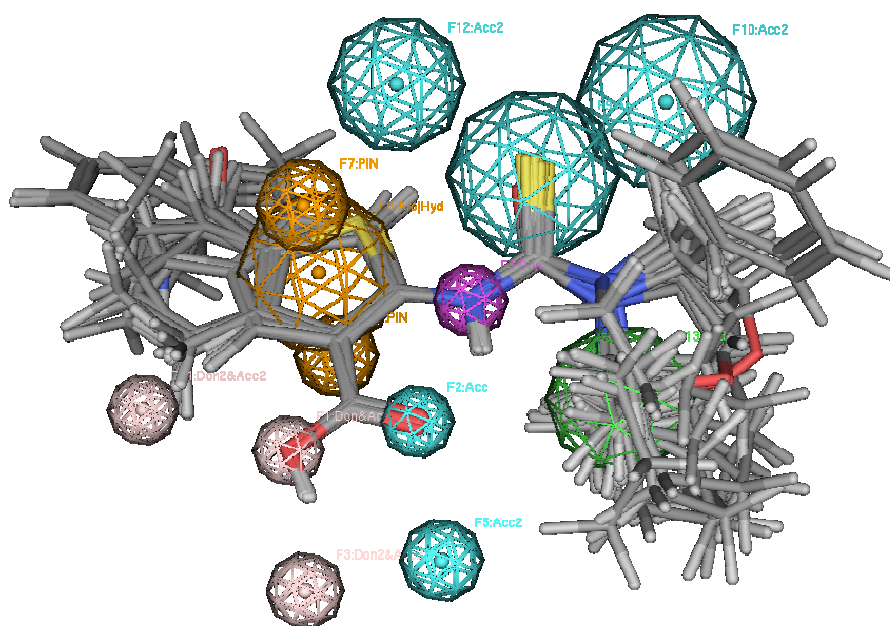


Abbildung 52: Alignment aller an MRP1 Zellen aktiven Gü-Verbindungen und das daraus entstandene Pharmakophormodell. Es gibt die Minimalanforderungen an einen MRP1-Inhibitor der Gü-Verbindungsklasse wider. Orange: π -Elektronensystem; blau: Wasserstoffbrücken-Akzeptor; grün: Hydrophobes-Zentrum; Magenta: Wasserstoffbrücken-Akzeptor; grau: Wasserstoffbrücken Donor und Akzeptor.

Das Pharmakophormodell gibt die Minimalanforderung an einen MRP1-Inhibitor der Gü-Verbindungsklasse wieder: Es besteht aus einem aromatischen Ring mit einer Säurefunktion, in deren ortho-Position eine Wasserstoffbrückenakzeptorfunktion (Harnstoffstickstoff), gefolgt von einer Carbonylfunktion (Schwefel- bzw. Sauerstoff des Thio-/Harnstoffes) und einem

hydrophoben Zentrum. Interessanterweise scheint der zweite, disubstituierte Stickstoff des Thio-/Harnstoffs keine besondere Funktion im Pharmakophormodell zu haben, obwohl in den biologischen Untersuchungen eine wichtige Funktion gezeigt werden konnte. Ein Austausch dieses Stickstoffes durch einen Sauerstoff, führte z.B. zu einem Wirkverlust. Ursachen für diese Beurteilung könnten sein, dass nur aktive Substanzen für das Modell verwendet wurden oder dass die Substituenten an den Sauerstoffen zu klein waren, um das benötigte hydrophobe Zentrum auszufüllen. In Abbildung 53 wurden die erhaltenen Ergebnisse nochmals graphisch zusammen gefasst.

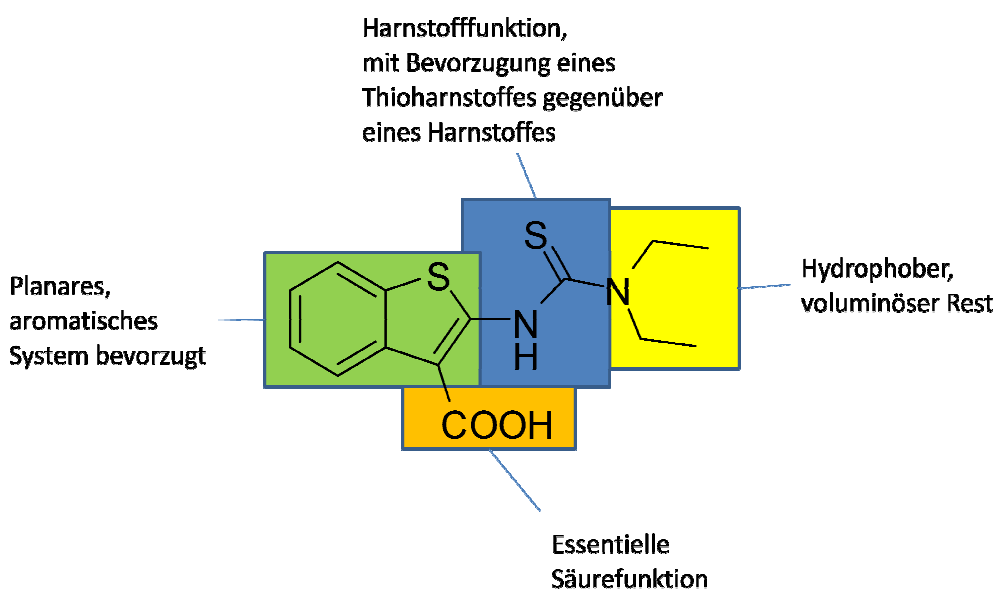


Abbildung 53: Graphische Zusammenfassung der Struktur-Wirkungsbeziehungen der Gü-Verbindungen.

4.6.4 Gü-Verbindungen als Aktivatoren an MRP2

Für MRP2 wurde von einigen Arbeitsgruppen eine allosterische Bindungsstelle für β -Estradiol-17-(β -D-Glukuronid) (E_{217G}) sowohl für das humane als auch das Rattenanalogon postuliert [143-145]. Es lag also nahe dies auch am rekombinanten MRP2 in MDCKII-Zellen zu überprüfen, wobei ein aktivierender Effekt von E_{217G} auf den Calcein-AM-Transport demonstriert werden konnte. In Abbildung 54 ist der aktivierende Effekt von E_{217G} anhand der Dosis-Wirkungskurve dargestellt. Es besitzt einen pEC_{50} von $3,938 \pm 0,156$, was einer EC_{50} von $115 \mu\text{mol/l}$ entspricht. Dieser Wert entspricht dem K_m -Wert, der von verschiedenen Arbeitsgruppen ermittelt wurde. Dort wird dieser zwischen 94 - $120 \mu\text{mol/l}$ angegeben [144, 146, 147].

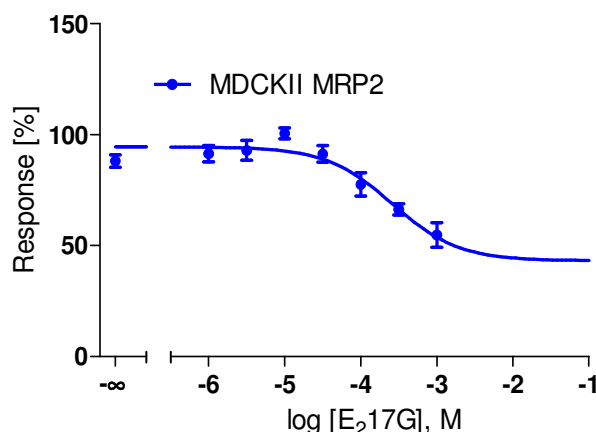


Abbildung 54: Dosis-Wirkungskurve von E₂17G im Calcein-AM-Assay für MRP2. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n > 3$ unabhängigen Experimenten.

Beim Screening der Gü-Substanzen an MRP2 fiel ein ähnlicher Effekt auf (Vergl. Abbildung 55). Es kam auch hier zum Absinken der Calcein-Fluoreszenz und nicht wie zu erwarten zu einem Anstieg. Erst nach Erreichen der maximalen Aktivierung kommt es z.B. bei Gü 658 wieder zum Anstieg der Fluoreszenz. Ein Grund hierfür kann sein, dass die Gü-Verbindungen Aktivatoren für MRP2 sind und erst bei sehr hohen Konzentrationen inhibitorische Eigenschaften besitzen. Es wurden nur einige wenige Gü-Verbindungen genauer auf ihren aktivatorischen Effekt gegenüber MRP2 untersucht, da es Ziel dieser Arbeit war Inhibitoren für MRP2 zu identifizieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 41 zusammengestellt.

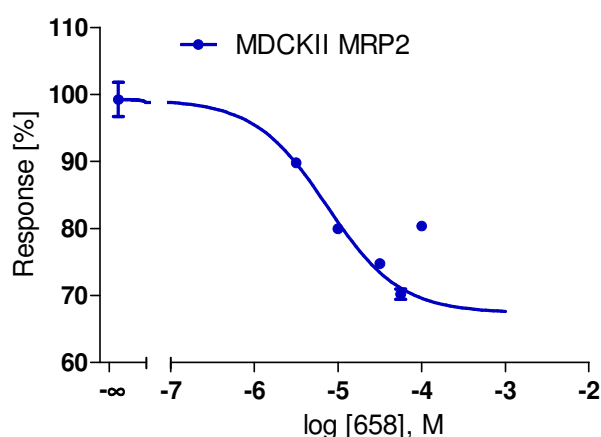


Abbildung 55: Dosis-Wirkungskurve von Gü 658 im Calcein-AM-Assay für MRP2. Gü 658 zeigt eine ähnliche Aktivierungskurve wie E₂17G. Bei hohen Konzentrationen kommt es wieder zur Inhibition. Abgebildet ist ein typisches Experiment einer Doppelbestimmung aus einer Serie von $n > 3$ Experimenten. Ab einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ beginnt Gü 658 den Transport zu inhibieren.

Tabelle 41: Aktivitätsdaten für alle an MRP2 getesteten Gü-Verbindungen.

Bezeichnung	EC ₅₀ [μmol/l]	Hill-Koeffizient
	pEC ₅₀	
658	4,127 ± 2,405	-1
	5,436 ± 0,236	
686	2,561 ± 0,839	-1
	5,608 ± 0,012	
1524	3,837 ± 1,210	-1
	5,432 ± 0,140	
1525	26,69 ± 5,98	-1
	4,581 ± 0,093	
1527	6,155 ± 0,162	-1
	5,211 ± 0,011	
1541	41,09 ± 27,02	-1
	4,460 ± 0,325	
1545	2,858 ± 1,865	-1
	5,596 ± 0,307	

Eine Korrelation zwischen der MRP1-Inhibition und der MRP2-Aktivierung konnte nicht gefunden werden (Vergl. Abbildung 56). Da es sich bei der Aktivierung um eine allosterische Wechselwirkung handelt und diese sich ganz anders äußert, als eine Inhibition, konnte dies erwarten werden. Das Fehlen einer Korrelation der Daten demonstriert aber auch, dass MRP1 und MRP2 nicht vollständig identisch sind und es auch zu unterschiedlichen Interaktionen und Ausprägungen der Effekte (einmal Inhibition (MRP1) und einmal Aktivierung (MRP2)) kommen kann.

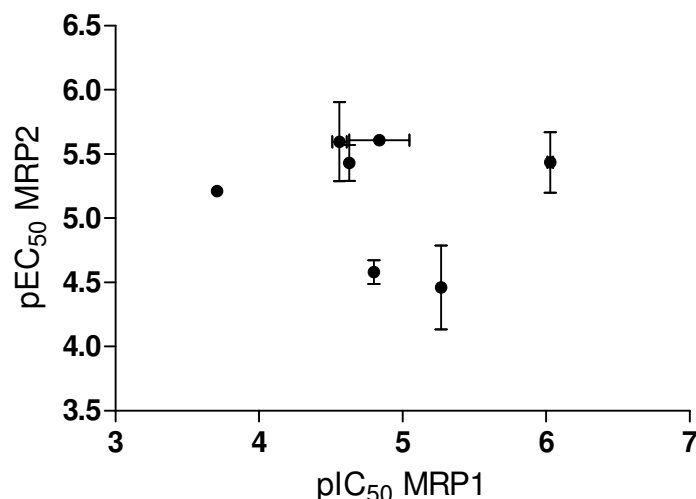


Abbildung 56: Darstellung der Aktivitätsdaten der Gü-Verbindungen aus der MRP1- mit den Daten aus der MRP2-Testung.

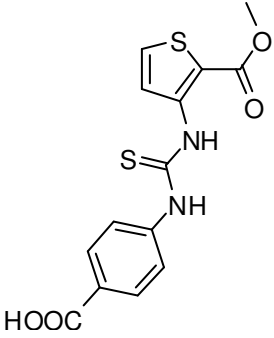
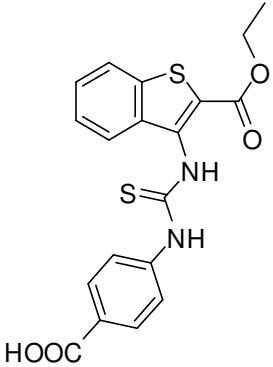
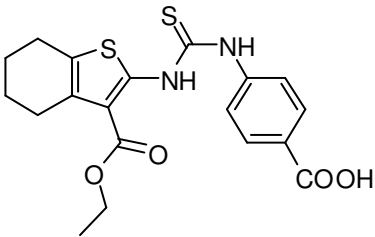
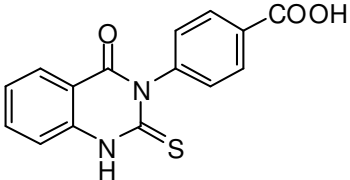
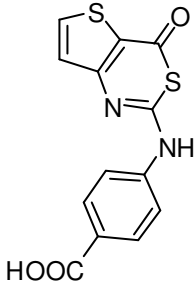
Beim Vergleich der EC_{50} -Werte für die einzelnen Substanzen ist zu erkennen, dass die Ergebnisse im Großen und Ganzen sehr dicht bei einander liegen. Lediglich Gü 1525 und Gü 1541 haben deutlich schlechtere EC_{50} -Werte als die anderen Verbindungen. Im Falle von Gü 1541 könnte dies am Austausch des Schwefels im Thioharnstoff gegen eine Sauerstofffunktion liegen. Schon im MRP1-Assay führte dies in der Regel zu einer Verschlechterung der Aktivität. Einen Grund für die schlechte Aktivität für Gü 1525 kann an dieser Stelle allerdings nicht gegeben werden. Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist im Fall von MRP2 häufig vom verwendeten Assay abhängig, ob bestimmte Modulatoren als Aktivatoren oder als Inhibitoren fungieren [71]. Wahrscheinlich würden die hier diskutierten Gü-Verbindungen in einem E_{217G} basierten Assay, wie z.B. von Pederson et al. [147] verwendet, als Inhibitoren fungieren. Dies müsste aber in weiteren Versuchen belegt werden.

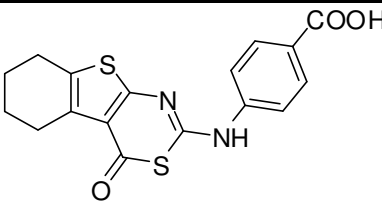
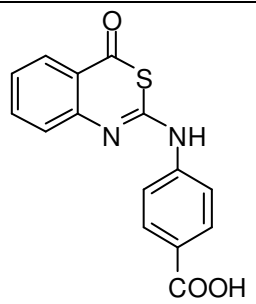
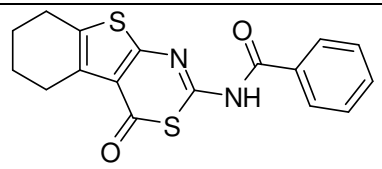
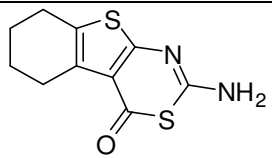
4.7 Gü-Verbindungen vom p-Aminobenzoesäure-Typ

4.7.1 Allgemeiner Aufbau der Modulatoren

Alle aktiven Modulatoren vom p-Aminobenzoesäure-Typ besitzen eine p-Aminobenzoesäure-Partialstruktur, deren Amino-Funktion substituiert wurde. Neben ringoffenen Thioharnstoffen existieren auch die entsprechenden zyklischen Systeme, die wiederum differenziert substituiert wurden. In Tabelle 42 sind alle getesteten Modulatoren aufgelistet.

Tabelle 42: Strukturformeln aller aktiven und inaktiven Substanzen vom p-Aminobenzoesäuretyp.

Bezeichnung	Strukturformel	Protein	IC ₅₀ [μmol/l] pIC ₅₀	Hill-Koeffizient
Gü 1672		MRP1	> 200	-
			< 3,7	
		MRP2	> 200	-
			< 3,7	
Gü 1673		MRP1	83,52 ± 8,71	1
			4,080 ± 0,045	
		MRP2	> 200	-
			< 3,7	
Gü 77		MRP1	20,38 ± 3,61	2,781 ± 0,668
			4,695 ± 0,078	
		MRP2	> 200	-
			< 3,7	
Gü 1677		MRP1	k. E.	-
		MRP2	k. E.	-
Gü 1675		MRP1	> 200	-
			< 3,7	
		MRP2	> 200	-
			< 3,7	

Bezeichnung	Strukturformel	Protein	IC ₅₀ [μmol/l] pIC ₅₀	Hill-Koeffizient
Gü 83		MRP1	1,211 ± 0,288	1
			5,925 ± 0,106	
		MRP2	21,53 ± 5,87	2,185 ± 0,362
			4,678 ± 0,122	
Gü 1676		MRP1	> 200	-
			< 3,7	
		MRP2	> 200	-
			< 3,7	
Gü 108		MRP1	k. E.	-
		MRP2	k. E.	-
Gü 68		MRP1	k. E.	-
		MRP2	k. E.	-

k. E. = kein Effekt

4.7.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen für MRP1 und MRP2

Gü 83 ist der einzige Inhibitor aus dieser Reihe, der zu einer Vollinhibition von MRP1 und MRP2 führte (Abbildung 57). An MRP1 konnten des Weiteren Gü 77 und Gü 1673 den Calcein-AM-Transport vollständig hemmen, während alle übrigen Verbindungen dieser Reihe weder an MRP1 noch an MRP2 eine ausreichend inhibitorische Wirkung zeigten. Gü 77 und Gü 1673 unterscheiden sich hauptsächlich im ankondensierten Ring am Thiophen. Während Gü 77 einen ankondensierten Cyclohexyrling besitzt, verfügt Gü 1673 über einen Benzenring. Des Weiteren unterscheiden sich die Verbindungen in der Anordnung der Esterfunktion und der

Thioharnstofffunktion am Thiophenring. Während Gü 1673 in α -Stellung zum Schwefel im Thiophenring die Esterfunktion und in β -Position die Thioharnstofffunktion aufweist, ist es bei Gü 77 umgekehrt. Generell lassen sich alle Gü-Verbindungen vom p-Aminobenzoessäure-Typ mit Thiophenstruktur nochmals in der Anordnung der Substituenten unterscheiden, wobei die Verbindungen mit einer Esterfunktion in β -Position die inhibitorisch aktivsten Modulatoren darstellten (Gü 77, Gü 83). Der ringgebundene Schwefel könnte somit einen wichtigen Interaktionspunkt (H-Akzeptor) darstellen. Jedoch zeigten die Verbindungen Gü 676 und Gü 647 aus Kapitel 4.6.2, dass die Orientierung des Thiophenrings wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle für die Aktivität spielt, sodass die verschiedenen Thiophenverbindungen trotz des unterschiedlichen Substitutionsmusters als gleichwertig diskutiert werden sollen. Was weiterhin für diese These spricht, ist, dass Gü 1673 trotz der anderen Substitution trotzdem eine Aktivität an MRP1 zeigt.

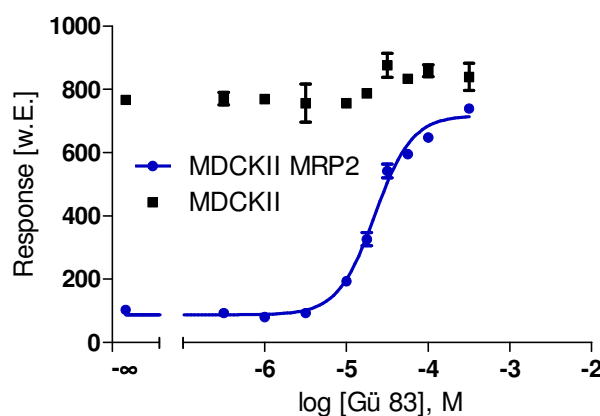


Abbildung 57: Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve von Gü 83 an MRP2. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n > 3$ unabhängigen Experimenten.

Gü 77 ist etwa viermal stärker inhibitorisch wirksam als Gü 1673, was auf eine Bevorzugung eines voluminöseren Restes an dieser Stelle schließen lässt. Gü 83 dagegen stellt ein zyklisiertes Derivat von Gü 77 dar wobei durch den Ringschluss die Aktivität von $IC_{50}=20,4 \mu\text{mol/l}$ auf $1,21 \mu\text{mol/l}$ an MRP1, um einen Faktor von ungefähr 20 erhöht werden konnte. Dies deutet auf eine Bevorzugung der ringgeschlossenen Derivate hin. Wird der Unterschied der Inhibition an MRP1 und MRP2 von Gü 83 betrachtet, so zeigt sich eine ca. 20-fache Verschlechterung der Aktivität an MRP2. Wird dieser Unterschied auf die beiden an MRP1 aktiven Substanzen Gü 77 und Gü 1673 übertragen, so erklärt dies, warum beide Verbindungen an MRP2 keine Voll-

inhibition im Rahmen der löslichen und untoxischen Konzentrationen herbeiführen konnten. Gü 1675 und Gü 1672 stellen Ring-Deletionen von entweder Gü 83 oder Gü 77 dar. Beide waren im gemessenen Konzentrationsbereich inaktiv, sowohl an MRP1 als auch an MRP2, was auf einen wichtigen Interaktionspunkt des lipophilen Restes am Thiophenring mit den Transportern schließen lässt. Auch die Säurefunktion scheint eine wichtige Rolle für die inhibitorische Aktivität der Substanzen zu spielen. Fehlt diese, wie z.B. in Gü 68 und Gü 108, so geht trotz des Vorhandenseins der Grundstruktur von Gü 83 eine Inhibition des Calcein-AM-Transportes verloren. Ein Austausch des Thiophenringes durch einen Benzenring (Gü 1676 und Gü 1675) führt zu keiner Verbesserung der Aktivität, da beide Substanzen keinen Effekt an MRP1 und MRP2 zeigten. Ähnliches gilt für eine Änderung des Ringschlusses und einer damit verbunden veränderten Ausrichtung der Säurefunktion; wie in Gü 1677. Auch hier konnte keine Aktivität gezeigt werden. Einige der vorgestellten Verbindungen wurden auch auf ihre modulatorischen Eigenschaften gegenüber P-gp getestet, darunter Gü 83, Gü 77, Gü 68 und Gü 108. Das Ergebnis der Testung ist in Abbildung 58 dargestellt. Das kleinste Derivat (Gü 68) zeigt die stärkste inhibitorische Wirksamkeit an P-gp während alle anderen getesteten Substanzen (Gü 83, Gü 77 und Gü 108) keine Inhibition zeigten. Ein Grund hierfür könnte sein, dass Gü 68 die einzige Substanz darstellt, die keine Carbonsäurefunktion und damit keine negative Ladung bei physiologischem pH-Wert enthält. P-gp ist im Gegensatz zu den MRPs in der Regel nicht in der Lage Anionen zu transportieren [117, 148].

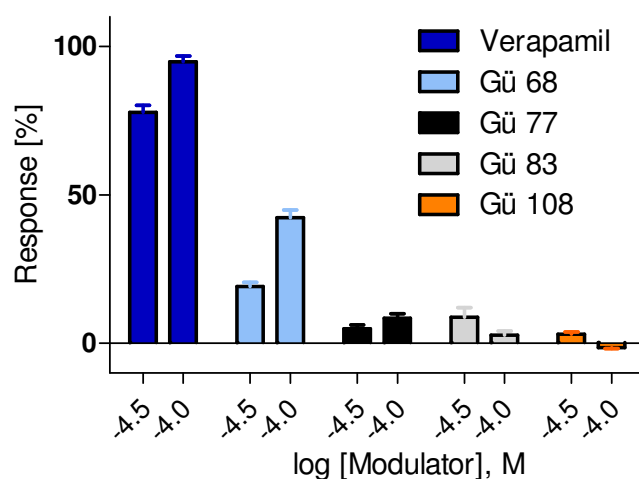


Abbildung 58: Aktivitätsdaten ausgewählter Vertreter der p-Aminobenzoessäure-Derivate und ihre inhibitorische Wirkung an P-gp im Vergleich zu Verapamil. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unterschiedlichen Versuchen jeweils als Doppelbestimmung.

4.8 Allgemeine Diskussion der Ergebnisse der MRP-Inhibitoren

Die besten Modulatoren (Gü 83, Gü 658 und LM 20.5) aus den untersuchten Substanzklassen sind zumindest im Calcein-AM-Assay für MRP1 und MRP2 alle besser als die Standardinhibitoren Indometacin, Verapamil und Cyclosporin A. Im Gegensatz zu den LM-Verbindungen besitzen weder Gü 83 noch Gü 658 eine inhibitorische Wirkung an P-gp, sodass sie als selektive MRP-Inhibitoren bezeichnen werden können. Im Gegenzug könnte LM 20.5 „multispezifisch“ genannt werden, da es alle drei getesteten Transportproteine im unteren bis mittleren mikromolaren Bereich hemmt. Die Gü-Verbindungen sind ungefähr viermal stärker wirksam an MRP1 als LM 20.5. Dafür besitzt LM 20.5 eine ungefähr dreimal bessere inhibitorische Aktivität für MRP2 als Gü 83. Im Vergleich zu literaturbekannten Inhibitoren sind besonders die Aktivitätsdaten der besten Gü-Verbindungen mit denen der besten Substanzen aus vielen MRP1 Publikationen vergleichbar. Beispiele für im Text erwähnte Strukturen sind in Abbildung 59, Abbildung 60, Abbildung 61 und Abbildung 62 dargestellt. Darunter z.B. Flavonoide wie das Dehydrosilybin, das eine IC_{50} von $1,1 \mu\text{mol/l}$ besitzt [149], oder das Raloxifen-Derivat LY329146, das die LTC_4 Aufnahme in MRP1 Membranvesikel mit einer IC_{50} von $0,8 \mu\text{mol/l}$ verhindern konnte [150, 151]. Die Raloxifen-Derivate sind die Substanzen, die der Substanz Gü 658 aufgrund der ebenfalls vorhandenen Benzothiophenstruktur am ähnlichsten sind. Diese Verbindungen gelten als Analoge zu Estradiol, das Raloxifen-Analogon LY329156 gilt aufgrund seiner partiell negativ geladenen Methylsulphonylgruppe, die mit dem Glukuronid überlagerbar sein soll, sogar als Analoges zu β -Estradiol-17-(β -D-Glukuronid) [150]. Dies könnte auch erklären, warum Gü 658 und dessen Analoga an MRP2 eine ähnliche Modulation in Form einer Aktivierung zeigen wie E_217G (siehe auch Kapitel 4.11.3). Weitere Verbindungen, die spezifisch für MRP1 entwickelt wurden, waren trizyklischen Isoxazole, die ebenfalls von der Firma Eli Lilly entwickelt und getestet wurden [152]. Auch die Wirksamkeit der besten Substanz dieser Gruppe (LY402913) liegt bei einer IC_{50} von $0,9 \mu\text{mol/l}$ in einem LTC_4 -Uptake Assay, was in der Größenordnung von Gü 83 und Gü 658 liegt. LY402913 wurde zusätzlich auf seine inhibitorischen Eigenschaften gegenüber P-gp untersucht. Es wurde gezeigt, dass sie 22-mal selektiver gegenüber MRP1 ist [152]. Für Gü 83 und Gü 658 hingegen konnte keine P-gp-Aktivität nachgewiesen werden.

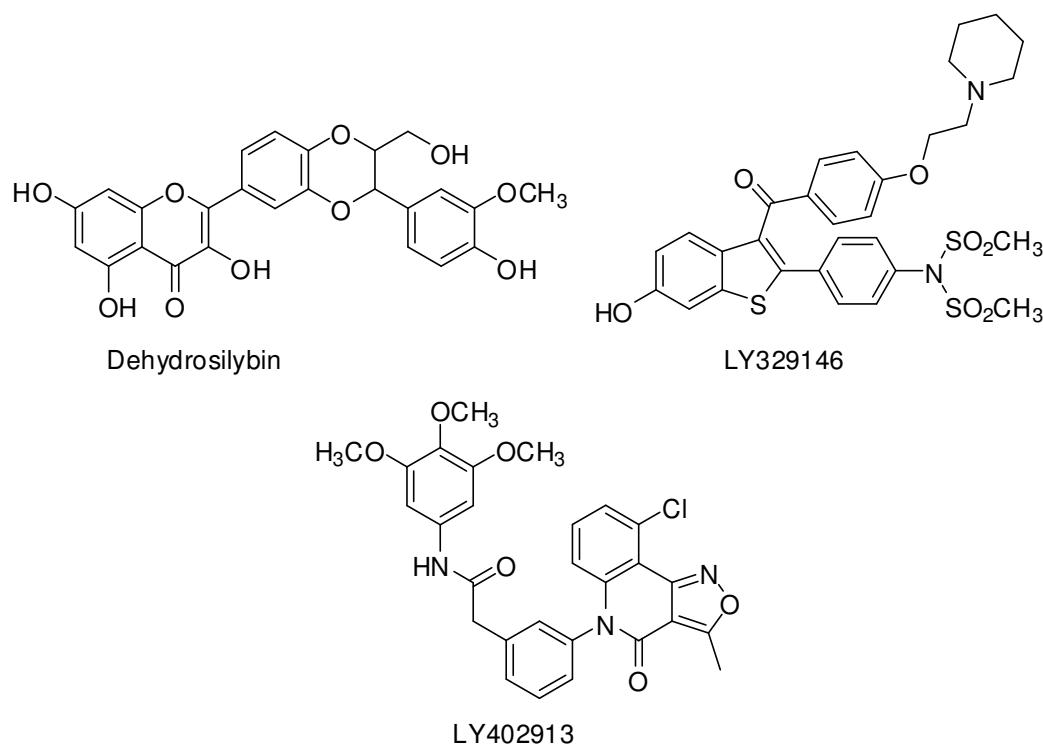
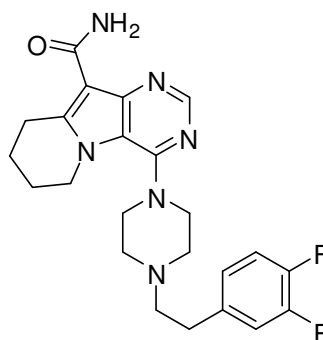


Abbildung 59: Strukturformeln bekannter MRP1 Inhibitoren.

Im Jahr 2005 wurde von der Zhou et al. ein Artikel über die Synthese und Testung einer Reihe von 4-Aryl-1,4-dihydropyridinen publiziert. Da diese nur an MRP1 untersucht wurden, können nicht direkt Aussagen über ihre Selektivität gemacht werden [153]. Jedoch ist eine P-gp modulatorische Wirkung für andere Dihydropyridine bekannt [154]. Die Inhibition wurde über Einpunkt-Fluoreszenzmessungen im Daunorubicin-Uptake-Assay gemessen, wobei MK571 als Positiv-Kontrolle diente. Alle Verbindungen zeigten dort eine deutlich schlechtere Aktivität als der Standard. Da die besten, der hier getesteten Inhibitoren, eine deutlich höhere inhibitorische Wirkung als MK571 zeigten, ist davon auszugehen, dass LM 20.5, Gü 83 und Gü 658 bessere Modulatoren an MRP1 darstellen als die Dihydropyridine. Eine weitere MRP1-Inhibitor Substanzklasse sind die Dibenzocyclooctadien-Ligane, Naturstoffe aus *Schisandra chinensis* [155]. Sie wirken sowohl an P-gp als auch MRP1 inhibierend. An MRP1 konnte jedoch keiner diese Naturstoffe eine Vollinhibition bei einer Konzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ an HL60/ADR Zellen in einem Daunorubicin-Influx-Assay herbeiführen.

Als hochselektive Verbindungen wurden 2004 die Pyrrolopyrimidine (z.B. XR12890) vorgestellt [156, 157]. Die besten Verbindungen aus diesen Serien waren mit IC_{50} -Werten im 2stelligen nanomolaren Bereich und keiner Aktivität an P-gp bis 50 $\mu\text{mol/l}$ deutlich besser wirksam als die hier entwickelten. Gemessen wurden die Aktivitäten in einem Uptake-Assay mit radioaktiv markierten Daunomycin.



XR12890

Abbildung 60: Strukturformel eines selektiven MRP1 Inhibitors.

Als Dual-Inhibitoren für MRP1 und P-gp wurden die Chinazoline postuliert, die in etwa gleich hohe Aktivitäten an MRP1 und P-gp zeigten. Eine der besten Substanzen, Compound 18, hatte je nach Assay einen IC_{50} von ca. 1 $\mu\text{mol/l}$ (Daunomycin-Akkumulations-Assay) bzw. eine EC_{50} von ca. 3 $\mu\text{mol/l}$ (Potentiations-Assay gegen Daunorubicin) an beiden Transportern [122]. Sie bewegt sich ungefähr auf einem Niveau mit LM 20.5, das an MRP1 eine IC_{50} von ungefähr 3,7 $\mu\text{mol/l}$ und an P-gp von ca. 1,8 $\mu\text{mol/l}$ besitzt.

Ein Nachteil der bisher beschriebenen Verbindungen ist ihre schlechte Wasserlöslichkeit. Auf der Suche nach besser wasserlöslichen Substanzen wurden die Piperidylfluorendione entwickelt. Zur Erhöhung der Hydrophile enthalten sie sehr viele Stickstoffe. Auch sie besitzen eine etwa gleichausgeprägte P-gp und MRP1 inhibierende Wirkung [158]. Die beste Substanz dieser Klasse (HC-bis[BOC-Glu(OBzl)]) liegt mit einer IC_{50} von 1,2 $\mu\text{mol/l}$ an MRP1 und 1-2 $\mu\text{mol/l}$ an P-gp (beides Calcein-AM-Uptake-Assays) etwa auf dem gleichen Niveau wie Gü 658 und Gü 83. Im Vergleich zu LM 20.5 ist sie etwas potenter.

Eine weitere Verbindung, die als multispezifisch bezeichnet werden kann, ist VX-710. Sie war eine der ersten Substanzen, die als Dualinhibitor für MRP1 und P-gp Eingang in die klinische Prüfung gefunden hat [79]. Dabei zeigt VX-710 nicht nur eine inhibitorische Aktivität an den beiden zuvor genannten ABC-Transportern, sondern zusätzlich auch an ABCG2 [159-161]. Eine EC_{50} (Potentiations-Assay gegen Daunorubicin) konnte allerdings nur für MRP1 und P-gp gefunden werden. Der Wert lag für beide Transporter bei etwa 5 $\mu\text{mol/l}$ [122] und ist damit etwas schlechter als LM 20.5, Gü 658 und Gü 83. Wobei darauf hingewiesen werden muss, dass ein Potentiations-Assay nicht gut vergleichbar ist mit einem Uptake-Assay, da ersterer immer noch von der eingesetzten Zytostatika-Konzentration abhängig ist.

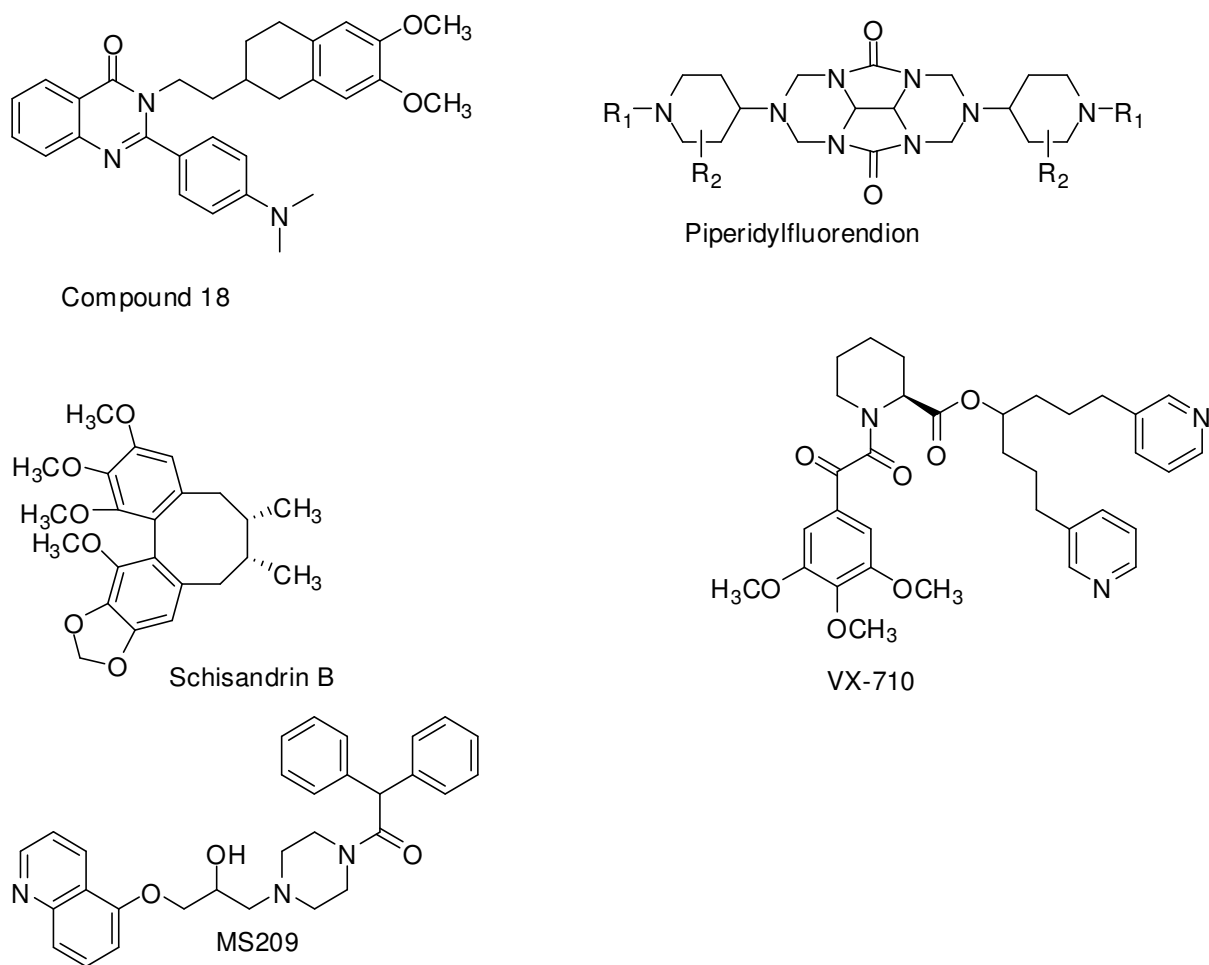


Abbildung 61: Strukturformeln einiger Dual-Inhibitoren für MRP1 und P-gp.

Ein weiterer multispezifischer Inhibitor, welcher es in die klinische Testung geschafft hat, ist das Chinolin-Derivat MS-209 [80]. In einer Spannweite von 1-10 $\mu\text{mol/l}$ ist es in der Lage die Resistenz in Multidrug resistenten P388/VCR Zellen aufzuheben (Akkumulations-Assay mit radioaktiven Doxorubicin) [162]. Da keine IC_{50} oder EC_{50} -Werte für einen einzelnen Transporter angegeben sind, ist ein Vergleich zu den hier entwickelten Modulatoren schwierig. Strukturell abgeleitet wurden die Verbindungen von Chinin und MK571, die bekannte MRP1 Inhibitoren darstellen [163].

Ob irgendwann eine der hier entwickelten Modulatoren oder Weiterentwicklungen davon in die *in vivo* Testung kommen, hängt noch von weiteren Tests z.B. ihrer Toxizität und ihrer Interaktion mit Stoffwechselenzymen wie z.B. Cytochrom P450 ab.

Interessanterweise ist keine (mit Ausnahme einiger Flavonoide [164, 165]) der oben erwähnten Substanzen auf ihre MRP2 inhibierenden bzw. modulatorischen Eigenschaften hin untersucht worden, obwohl auch für MRP2 eine Relevanz in der Krebstherapie [106, 166] nachgewiesen werden konnte. Es gibt nur wenige Veröffentlichungen, die sich mit einem Vergleich von

MRP1 und MRP2 beschäftigen. Darunter eine Veröffentlichung über Flavonoide aus dem Jahr 2005 [164]. 25 Flavonoide wurden untersucht, wobei das beste an MRP1 getestete Flavonoid (Diosmentin) eine IC_{50} von $2,7 \mu\text{mol/l}$ in einem Calcein-Efflux-Assay zeigte, aber in einer Konzentration von $25 \mu\text{mol/l}$ nur eine 84 prozentige Inhibition herbeiführte. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei Diosmentin evtl. nur um einen Partialinhibitor handelt. An MRP2 zeigte Diosmentin nur eine geringe Hemmwirkung; bei einer Konzentration von $25 \mu\text{mol/l}$ konnte gerade einmal eine 17 prozentige Inhibition hervorgerufen werden. Das beste Flavonoid an MRP2 war mit einer IC_{50} von ungefähr $15 \mu\text{mol/l}$ das Robenitin, eines von zwei Flavonoiden die eine IC_{50} unter $50 \mu\text{mol/l}$ besaßen. Im Vergleich zu LM 20.5 schneiden die Flavonoide also deutlich schlechter ab.

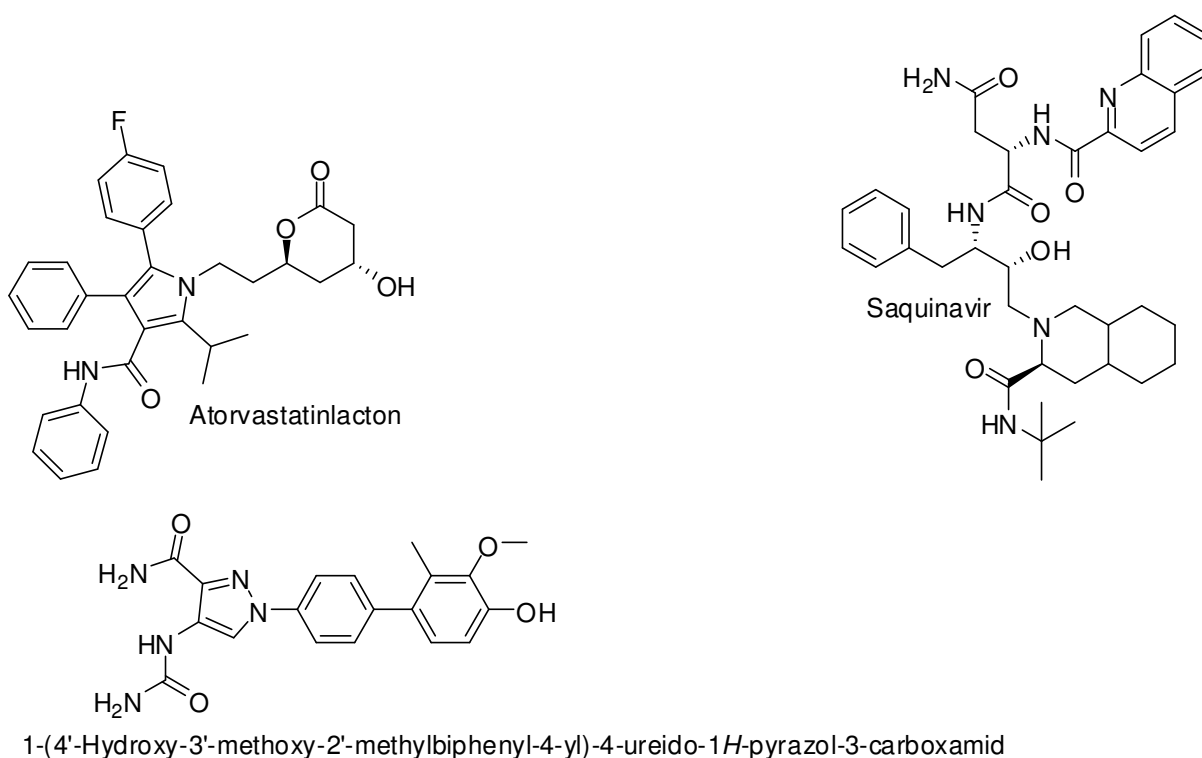


Abbildung 62: Strukturformeln bekannter MRP2 Inhibitoren.

Weitere Inhibitoren für MRP2 stellen die Statine dar. Sie wurden an P-gp und MRP2 untersucht [148]. Auffällig war, dass die freien Säuren der untersuchten Statine (Pravastatin, Atorvastatin, Lovastatin und Simvastatin) im Gegensatz zu den entsprechenden Lactonen keinen inhibitorischen Effekt zeigten. Die beste Substanz, das Atorvastatinlacton, zeigte einen IC_{50} -Wert von ca. $15 \mu\text{mol/l}$ in einem Calcein-Efflux-Assay. Auch hier zeigt LM 20.5 ein höheres Potential. Weitere Substrate von MRP2 für die keine IC_{50} -Werte gefunden werden konnten, sind die

HIV-Protease-Inhibitoren, die sowohl von MRP1, MRP2 als auch P-gp transportiert werden [167, 168] und die schon vorher erwähnten Biphenyl-substituierten-Heterocyclen [131].

In der Literatur gibt es besonders für MRP1 einige bekannte Modulatoren und Inhibitoren, während es für MRP2 nur wenige gibt. An MRP2 stellt LM 20.5 einen der zurzeit besten bekannten Modulatoren dar. Gü 83 ist eine ganz neue Verbindungsklasse für MRP1 und MRP2 Modulatoren. Gü 658 ist wahrscheinlich mit Raloxifen strukturverwandt. Nichtsdestotrotz stellen beide Gü-Verbindungen selektive Inhibitoren für MRPs dar, da sie insbesondere an P-gp keine modulatorischen Eigenschaften aufweisen. Mit den LM-Verbindungen konnte eine neue Klasse unspezifischer Modulatoren entwickelt werden, an denen der besonders hohe Verwandtschaftsgrad zwischen MRP1 und MRP2 und eine entferntere Verwandtschaft zu P-gp demonstriert werden konnte.

Für alle hier neu vorgestellten Inhibitoren wären weiterführende Untersuchungen an anderen MRPs, wie MRP3 und MRP6, sowie ABCG2 interessant, um ihre Selektivität weiter zu untersuchen.

4.9 Glutathion

4.9.1 Halbquantitative Bestimmung des intrazellulären Glutathions

Glutathion ist ein Tripeptid, das in der Zelle an vielen unterschiedlichen Prozessen beteiligt ist, unter anderem an Prozessen, die der Detoxifikation dienen, aber auch in der Stressantwort soll es eine Rolle spielen. Es soll in der Lage sein, mit einer Vielzahl von Molekülen und Metallionen Verbindungen einzugehen. Diese sogenannten Konjugate können dann über einen Transporter zum Beispiel MRP1 oder MRP2 hinaus transportiert werden [169, 170]. Um diesen Effekt genau zu untersuchen ist es nötig, die intrazelluläre GSH-Konzentration zu kennen. Im Folgenden soll eine relativ einfache halbquantitative Methode der intrazellulären GSH-Bestimmung vorgestellt werden.

Tabelle 43: Mittelwert, Standardabweichung und relativer Fehler aller Qualitätskontrollen.

Qualitätskontrolle [μmol/l]	Mittelwert [μmol/l]	Standardabweichung. [μmol/l]	Rel. Fehler [%]
0,5	0,45	0,02	10,90
30	32,06	0,33	6,87

GSH ist in der Lage mit Naphthalendialdehyd ein fluoreszierendes Isoindoladdukt zu bilden, dessen Fluoreszenzintensität proportional zur GSH-Konzentration ist. In Abbildung 63 sind Floreszenz-Zeit-Diagramme von verschiedenen GSH-Konzentrationen in An- und Abwesenheit von DTT exemplarisch dargestellt. Auffällig ist, dass die Reaktion ohne DTT deutlich rascher abläuft und die Sättigungskurven schneller ein Plateau erreichen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass das DTT ebenfalls mit NDA reagiert und/oder DTT die Reaktion zum Isoindoladdukt umkehren kann. Um Richtigkeit und Präzision der Umsetzung zu quantifizieren wurden Qualitätskontrollen hergestellt, deren Ergebnisse in Tabelle 43 zusammengefasst sind. Die niedrigste Probe wich dabei nicht mehr als 15 % von dem Nominalwert ab und die oberste blieb mit einer relativen Abweichung von 6,87 % unter 10 % Abweichung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass Präzision und Richtigkeit gegeben waren.

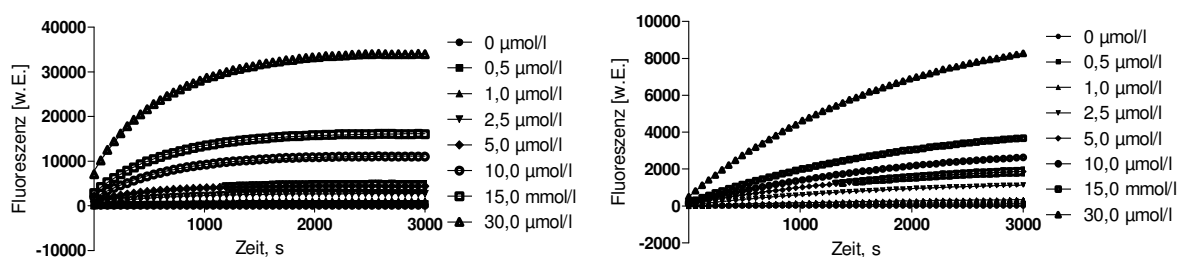


Abbildung 63: Fluoreszenz-Zeit-Diagramme des fluoreszierenden Isoindoladduktes aus GSH und NDA bei verschiedenen GSH Konzentrationen. Links ohne Zusatz von DTT, rechts mit DTT eines typischen Experiments als Doppelbestimmung.

Beim Auftragen der maximalen Fluoreszenzwerte der Plateaus gegen die GSH-Konzentration zeigten sich, sowohl für die Kurven mit als auch ohne DTT, Geraden (Abbildung 64), sodass demonstriert werden konnte, dass ein linearer Zusammenhang zwischen GSH-Konzentration und der Fluoreszenz besteht. In Abbildung 64 sind exemplarisch jeweils eine Kalibriergerade mit und ohne Zusatz von DTT dargestellt. Mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,998 (ohne DTT) und 0,990 (mit DTT) sind beide Geraden als Kalibriergeraden geeignet.

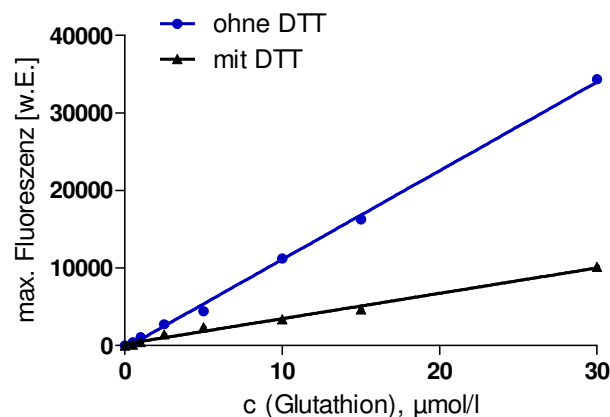


Abbildung 64: Kalibriergeraden zur intrazellulären GSH-Bestimmung eines typischen Experiments als Doppelbestimmung. Bestimmtheitsmaß R^2 für die Gerade ohne DTT betrug 0,998 und für die Gerade mit DTT 0,990.

In Abbildung 65 sind beispielhaft jeweils eine Kurve mit Standardfehler für eine intrazelluläre Bestimmung in MDCKII MRP2 Zellen mit und ohne DTT dargestellt. Es zeigte sich, dass der Kurvenverlauf nicht so gleichmäßig ist wie bei der Bestimmung von reinem GSH. Dennoch erreichen die Kurven ein Plateau, das zur Auswertung herangezogen werden konnte. Besonders deutlich ausgeprägt ist dieser Effekt bei Zusatz von DTT. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass das NDA noch mit anderen reaktiven Gruppen anderer löslicher Proteine reagieren und es so zu Reaktionsbehinderungen kommen kann. Durch DTT werden noch mehr reaktive Thiolgruppen freigesetzt, sodass größere Störungen auftreten können. Interessanterweise scheinen die meisten jedoch keine bei 595 nm anregbaren Produkte zu erzeugen, da es bei Blockierung der Glutathion-Synthese mittels Buthionsulfoxim nur zu minimaler Fluoreszenz kam (Vergl. Kapitel 4.10.3 und Abbildung 80). Eine weitere Bestätigung, dass NDA sehr spezifisch mit Glutathion reagiert, findet sich bei Orwar et al., die fluoreszenzmikroskopisch die Glutathionsyntheseorte, die sie mittels NDA anfärbten, untersuchen konnten [108].

Werden die aus den Fluoreszenzmaxima ermittelten intrazellulären Glutathionkonzentrationen gemittelt und die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien gegenüber gestellt, so ergeben sich die in Abbildung 66 und Abbildung 67 dargestellten Verteilungen. Mit durchschnittlich $8,77 \pm 1,31$ nmol GSH pro 1 Millionen Zellen enthielten die MDCKII Wildtypzellen am meisten Glutathion, gefolgt von den MDCKII MRP2 Zellen mit $5,98 \pm 1,86$ nmol GSH pro 1 Millionen Zellen und den MDCKII MRP1 Zellen, die mit $0,75 \pm 0,60$ nmol GSH pro 1 Millionen Zellen am wenigsten Glutathion enthielten. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die MRP-

Transporter in der Lage sind GSH zu transportieren und zum anderen, dass MRP1 GSH effektiver effluxieren kann als MRP2.

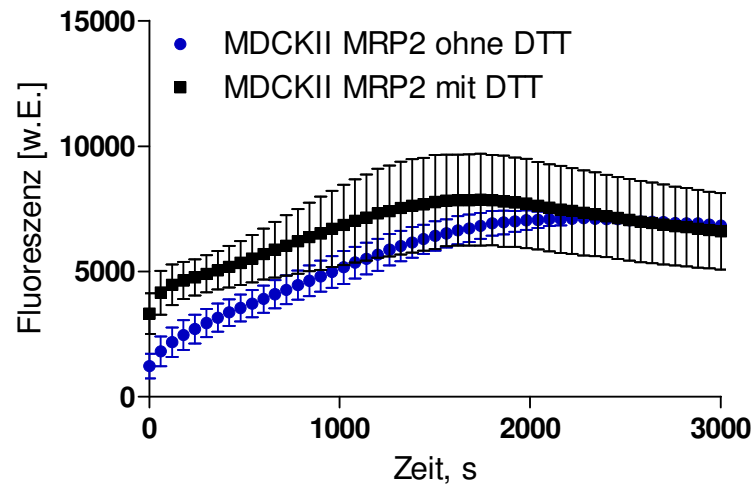


Abbildung 65: Beispielkurven für eine intrazelluläre GSH-Bestimmung in MDCKII MRP2 Zellen mit (■) und ohne (●) Zusatz von DTT. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Versuches als Doppelbestimmung.

Mit DTT-Zusatz ergab sich eine ähnliche Verteilung der Glutathionkonzentrationen, jedoch waren die Werte deutlich höher als ohne Zusatz (MDCKII: $19,38 \pm 5,68$, MDCKII MRP2: $20,98 \pm 4,82$ und MDCKII MRP1: $10,52 \pm 5,62$ nmol GSH pro 1 Millionen Zellen). Die Werte unterschieden sich alle um etwa 10 nmol von den Werten ohne DTT, sodass entweder davon ausgegangen werden muss, dass in allen Zelllinien die gleiche Menge an oxidiertem Glutathion enthalten ist oder dass die Unterschiede nur durch einen weniger steilen Verlauf der Kalibriergeraden hervorgerufen wurden. Im späteren Verlauf dieser Arbeit wurde auf die Durchführung mit GSSG-Spaltung durch DTT verzichtet und nur noch die intrazelluläre GSH-Menge ohne Zusatz von DTT bestimmt.

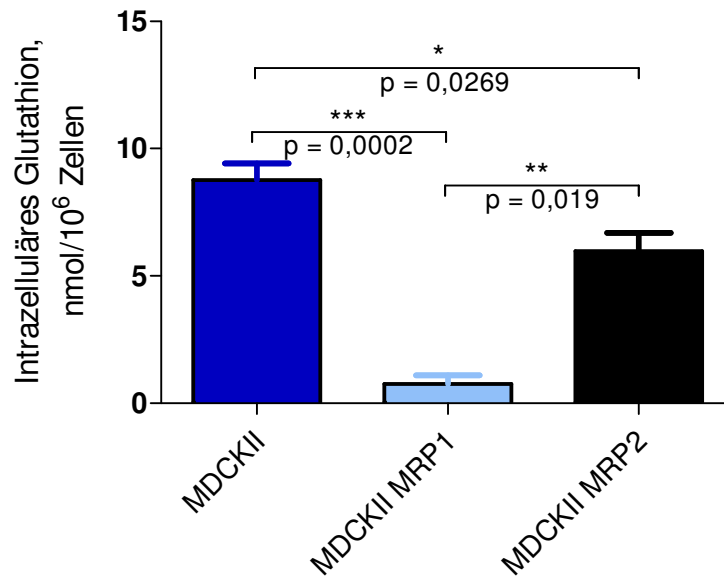


Abbildung 66: Ermittelte intrazelluläre GSH-Level pro 10⁶ Zellen der entsprechenden MDCKII-Zelllinien ohne Zusatz von DTT. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei Experimenten.

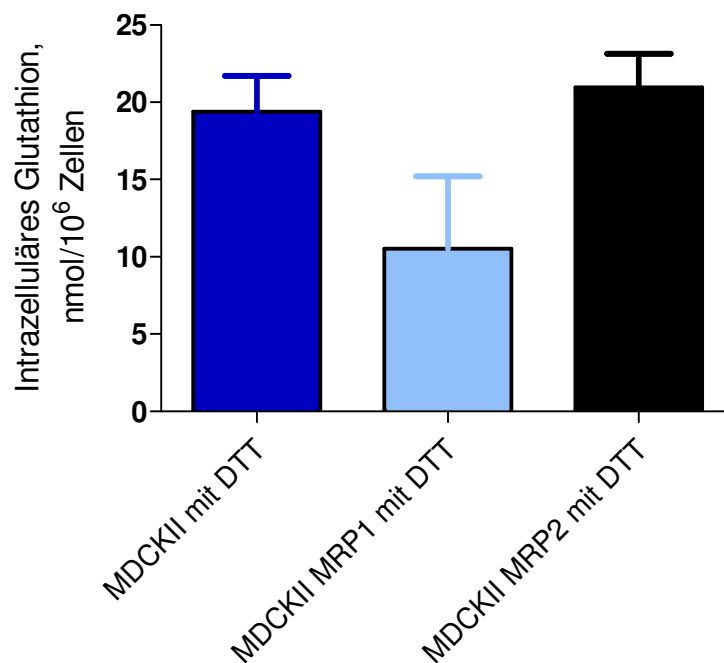


Abbildung 67: Ermittelte intrazelluläre GSH-Level pro 10⁶ Zellen der entsprechenden MDCKII-Zelllinien mit Zusatz von DTT. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei Experimenten.

Beim Vergleich der erhaltenen Verhältnisse mit anderen Glutathionbestimmungen aus der Literatur mit den gleichen Zelllinien fällt auf, dass die Verteilungen durchaus äquivalent sind. In Abbildung 68 sind beispielhaft die von Wortelboer et al. ermittelten intrazellulären Glutathionlevel dargestellt [171]. Trotz der unterschiedlichen Einheiten im Vergleich zum hier verwendeten Assay, kann die gleiche Größenordnung der Glutathionverteilung beobachtet werden. In den MDCKII Wildtyp-Zellen ist am meisten Glutathion enthalten, während in den transfizierten Zellen, besonders in den MRP1 Zellen deutlich weniger enthalten ist. Auch die Arbeitsgruppe um Evers et al. zeigte ein ähnliches Verteilungsverhalten des Glutathions innerhalb dieser Zelllinien [118]. Beide Gruppen lysierten die Zellen ebenfalls mit Säure und titrierten nach Neutralisation das GSH mittels einer von Tietze etablierten Methode, die auf der Spaltung von Disulfidbrücken in 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) und einer damit verbundenen Farbänderung beruht [172].

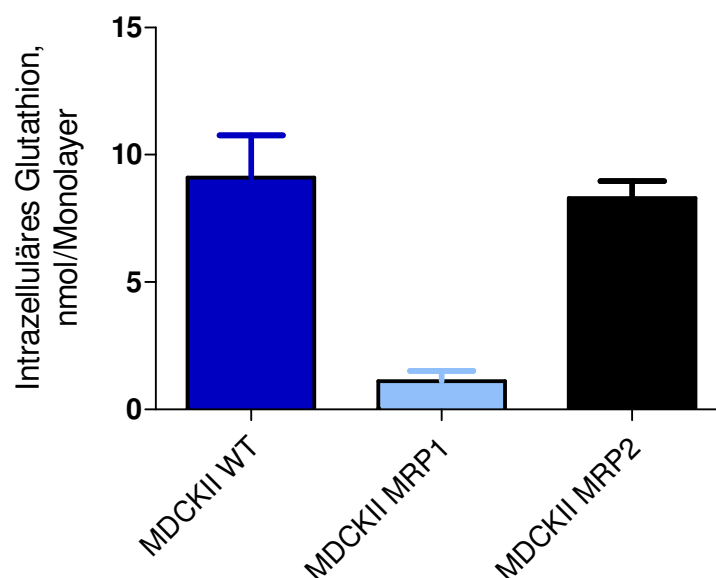


Abbildung 68: Intrazelluläre GSH-Level ermittelt von Wortelboer et al. (modifiziert nach [171]).

Zusammengefasst zeigt sich, dass die hier entwickelte Methode zur intrazellulären GSH-Bestimmung vergleichbare Ergebnisse liefert wie literaturbekannte Methoden, die mit den gleichen Zelllinien gearbeitet haben [118, 171]. Die Methode ist schnell und einfach durchzuführen. Ein Nachteil ist, dass eventuell andere lösliche Proteine mitbestimmt werden, sodass nur eine halbquantitative GSH-Bestimmung vorgenommen werden kann. Jedoch zeigen Versuche mit BSO, das die GSH-Synthese unterdrückt, eine signifikante Absenkung der gemessenen Fluoreszenz bis hin zum vollständigen Verschwinden.

Innerhalb der Zelllinien hat die MDCKII Wildtyp Zelllinie den höchsten Glutathiongehalt, während in den transfizierten Zelllinien, wahrscheinlich aufgrund ihrer erhöhten Fähigkeit Glutathion zu transportieren, weniger Glutathion enthalten (Abbildung 80).

4.9.2 Etablierung des Glutathion Efflux-Assays

Im Gegensatz zu der in Kapitel 4.9.1 beschriebenen Methode wurde nicht der Zellinhalt, sondern der Überstand nach Inkubation mit Modulatoren auf seinen GSH-Gehalt untersucht.

In der Literatur sind einige Substanzen beschrieben, die einen aktivierenden Einfluss auf die GSH-Transportrate des MRP1 besitzen, ohne selbst transportiert zu werden. Darunter sind unter anderem Verapamil [127, 173] und Apigenin, das bisher die stärkste GSH-Effluxaktivierung aufweist [173]. Verapamil wurde zunächst verwendet, um zu überprüfen, ob mit dem beschriebenen Versuchsaufbau (Vergl. Kapitel 1.5.5) ein Effekt messbar ist. Als Vergleich diente der entsprechende Wildtyp der verwendeten Zelllinie.

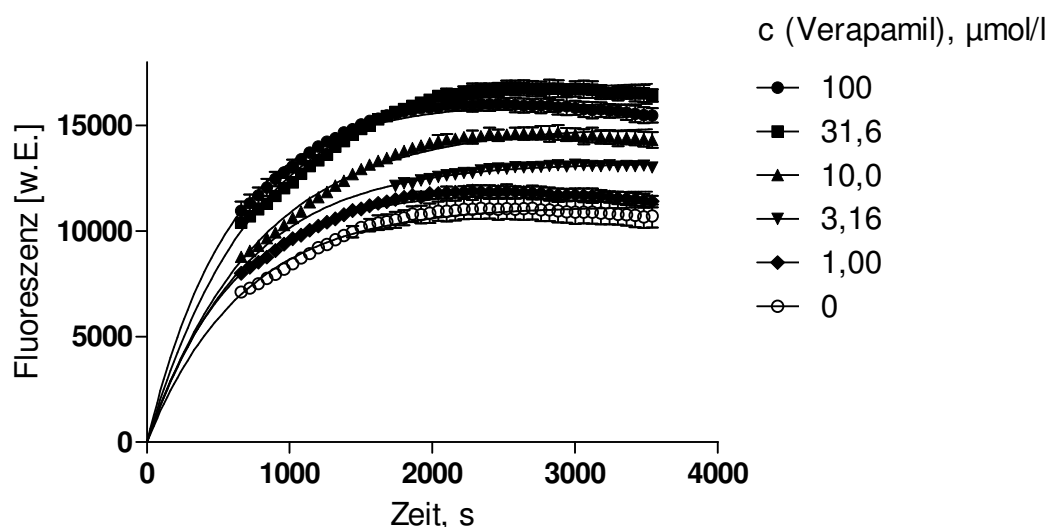


Abbildung 69: Fluoreszenz-Zeit Diagramm der Fluoreszenzzunahme der Derivatisierungsreaktion von NDA mit heraus transportiertem GSH in 2008 MRP1 Zellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 69 sind die Fluoreszenz-Zeit-Verläufe eines typischen Experiments dargestellt. Mit zunehmender Modulatorkonzentration steigt auch das Fluoreszenzmaximum an, was auf eine Zunahme des Glutathion-Effluxes schließen lässt. In Abbildung 70 und Abbildung 71 sind die zugehörigen Dosis-Wirkungskurven von Verapamil für die Zelllinienpaare MDCKII MRP1

und MDCKII sowie 2008 MRP1 und 2008 dargestellt. Besonders auffällig ist, dass der Kurvenverlauf zwar sehr ähnlich ist, aber auf unterschiedlichen Niveaus beginnt. Zu erwarten gewesen wäre, dass der Glutathion-Efflux in MRP1 transfizierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist. Dies ist aber nicht der Fall bei der MDCKII MRP1 Zelllinie, da diese bei einem deutlich niedrigeren Ausgangswert beginnt als der entsprechende Wildtyp.

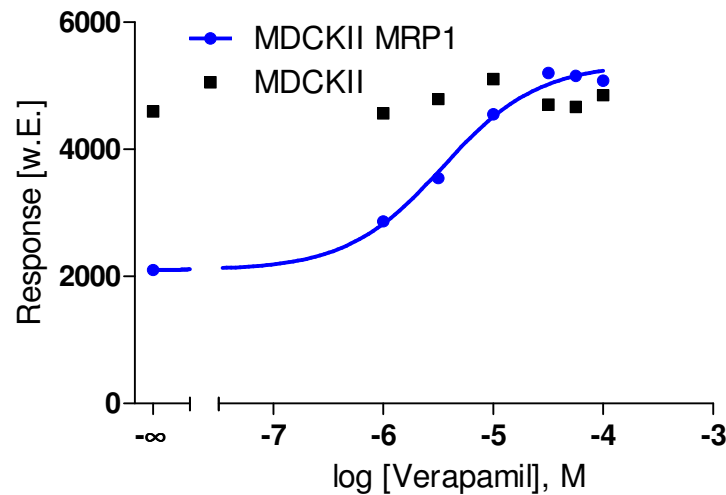


Abbildung 70: Dosis-Wirkungskurve des durch Verapamil stimulierten Glutathion-Effluxes in MDCKII MRP1 und MDCKII Wildtyp Zellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

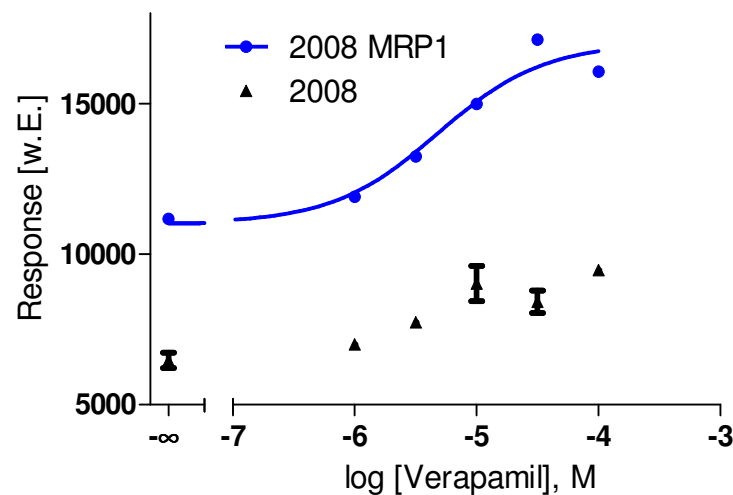


Abbildung 71: Dosis-Wirkungskurve des durch Verapamil stimulierten Glutathion-Effluxes in 2008 MRP1 und 2008 Wildtyp Zellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Mögliche Ursachen hierfür könnten unter anderem ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringerer intrazellulärer Gehalt an GSH (siehe auch Kapitel 4.9.1) oder andere regulatorische

Einflüsse auf das Glutathion sein. Im Gegensatz dazu zeigt die 2008 MRP1 Zelllinie den zu erwartenden Kurvenverlauf mit einem erhöhten Efflux aus der MRP1 transfizierten Zelllinie. Werden die IC_{50} -Werte der beiden Dosis-Wirkungskurven verglichen, zeigt sich, dass es hier kaum einen Unterschied gibt: IC_{50} (MDCKII MRP1) = $2,76 \mu\text{mol/l} \pm 0,82$ und IC_{50} (2008 MRP1) = $2,74 \mu\text{mol/l} \pm 0,40$. Unterschiede gibt es in der Ausprägung der durch Verapamil hervorgerufenen Efflux-Aktivierung von GSH. Während es in MDCKII MRP1 zu einer Verdoppelung des Glutathion-Effluxes kommt, erhöht sich die effluxierte GSH-Menge bei 2008 MRP1 nur ungefähr um das Eineinhalbfache. Nichtsdestotrotz wurden aufgrund der Tatsache, dass alle vorangegangenen Versuche mit der 2008 MRP1 Zelllinie durchgeführt wurden, auch alle GSH-Efflux-Experimente mit dieser Zelllinie durchgeführt.

Wie oben schon erwähnt ist auch Apigenin, ein Flavonoid, in der Lage den GSH-Efflux zu steigern [173]. Aus diesem Grund wurde auch diese Substanz zur Etablierung des Assays mit herangezogen.

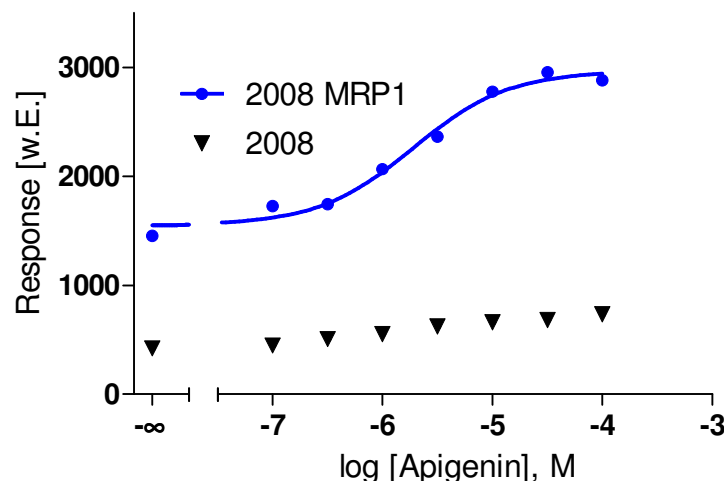


Abbildung 72: Dosis-Wirkungskurve des durch Apigenin stimulierten GSH-Effluxes. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments einer Doppelbestimmung aus einer Serie von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 72 ist die Dosis-Wirkungskurve von Apigenin dargestellt. Auch Apigenin zeigt in MRP1 transfizierten Zellen eine konzentrationsabhängige Steigerung der Fluoreszenz, die auf einen erhöhten Efflux von Glutathion zurückzuführen ist, während im Wildtyp nur ein geringer Anstieg zu beobachten ist. Dieser geringe Anstieg im Wildtyp ist auch mit Verapamil in der 2008 Zelllinie zu sehen und deutet wohl auf ein geringes Vorhandensein von MRP1 in

dieser Zelllinie hin. Schon in Kapitel 4.1 konnten im Westernblot geringe Mengen von MRP1 in der 2008 Zelllinie nachgewiesen werden.

Die Spanne vom Bottom bis Top ist mit einer Verdopplung etwas höher als bei Verapamil (1,5facher Wert). Im Vergleich zur Arbeit von Leslie et al. sind diese Werte um ca. 50 % kleiner. Für Apigenin erhielten die Autoren einen Faktor von 4,3 und für Verapamil einen von 3,7 [173]. Gründe hierfür könnten die unterschiedlichen verwendeten Assays sein. Während in dieser Versuchsdurchführung mit intakten, lebenden Zellen gearbeitet wurde, wurden von Leslie et al. isolierte inside out Zellmembranen von H69 AR Zellen verwendet. Diese sind für eine sehr hohe Expression des MRP1 bekannt [44]. Des Weiteren setzten sie eine relativ hohe Konzentration von radioaktiv markiertem [^3H]GSH (100 $\mu\text{mol/l}$) ein. Ein zusätzlicher Grund für die Unterschiede in der Vervielfachung der effluxiertem GSH-Menge können in der Diffusion der Modulatoren durch die Zellmembran begründet sein. Während sie an inside out Membranen ungehindert an die intrazelluläre Bindungsstelle des Proteins gelangen können, ist es bei intakten Zellen erst nach Passieren der Zellmembran möglich. Hinweise für einen solchen Zusammenhang geben Studien für P-gp, in denen ein Zusammenhang zwischen Membranpenetration und Wirkung diskutiert wird [134].

Mit der Bestimmung des effluxiertem GSH mittels Fluoreszenzmessung über NDA ist ein einfacher und schneller Weg entwickelt worden, die hinaus transportierte GSH-Menge zu quantifizieren. Im Gegensatz zu der von Leslie et al. verwendeten Methode muss weder eine Membranpräparation durchgeführt noch mit radioaktiven Substanzen gearbeitet werden [173, 174]. Die Nachteile des neuen Assays liegen darin, dass die Glutathionmenge innerhalb der Zellen nicht variiert werden, die MRP1-Menge nicht vorher quantifiziert und eingestellt werden kann und die Ausprägung der heraus transportierten GSH-Menge nicht so hoch ist. Vorteile sind die schnellere Durchführung, die unkomplizierte Vermessung sowie die Verwendung von lebenden Zellen, sodass auch Stoffwechselprodukte (sulfatierte oder glukuronisierte Verbindungen) ohne vorherige Synthese vermessen werden können.

4.9.3 Einfluss ausgewählter Modulatoren auf den Glutathion-Efflux

Nach der Etablierung des Assays, wurde aus jeder vermessenen neuen Verbindungsklassen (vergl. Kapitel 4.4, 4.6 und 4.7) ein Vertreter auf seine modulatorischen Eigenschaften bezüglich des GSH-Effluxes untersucht. Die verwendeten Modulatoren waren Gü 83, Gü 658, LM 20.7

und zwei Standardinhibitoren, Indometacin und MK571. Da in der oben zitierten Arbeit von Leslie et al. die maximale Erhöhung der GSH-Menge als Faktor zum Vergleich herangezogen wurde, wird die x-fache Erhöhung des effluxierten GSH auch in dieser Arbeit zum Vergleich der Substanzen herangezogen. In Abbildung 73 sind die maximalen Erhöhungen als Faktor des GSH-Effluxes dargestellt. Der Konzentrationsbereich der Substanzen lag bei allen Verbindungen zwischen 0,1 und 100 $\mu\text{mol/l}$.

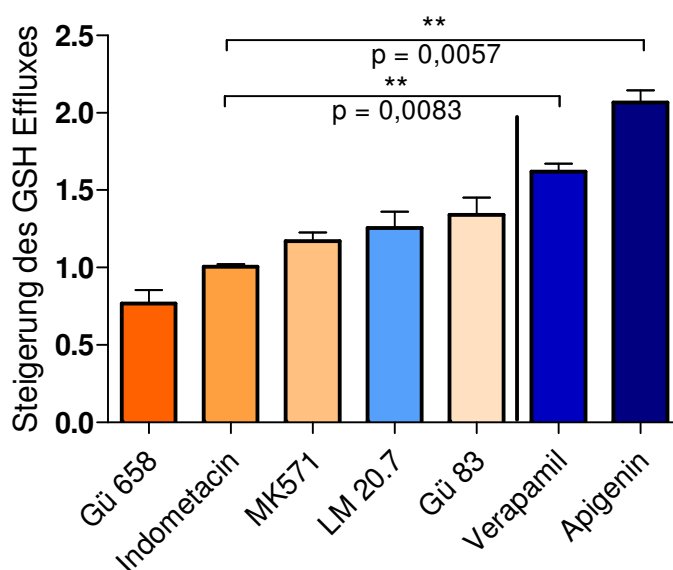


Abbildung 73: Erhöhung des Glutathion-Effluxes der ausgewählten Modulatoren als Faktor. Nur Verapamil und Apigenin erhöhen den Glutathion-Efflux signifikant ($p < 0,05$).

Besonders die kleinen Säuren, wie Indometacin und Gü 658 sind nicht in der Lage den GSH-Ausstrom zu beeinflussen, während die größeren lipophileren Säuren, wie MK571 und Gü 83 zu einem Anstieg der GSH-Menge führten. Jedoch unterschied sich keiner dieser Anstiege signifikant von Indometacin, das einen Faktor von ungefähr eins besitzt und als Vergleich diente. Lediglich die bereits bekannten Aktivatoren des GSH-Effluxes, Verapamil und Apigenin, steigern den Efflux signifikant. Bei vielen Substanzen ist nach Erreichen des Maximums eine deutliche Abnahme des hinaustransportierten GSH zu vermessen. In Abbildung 74 ist dies am Beispiel von Gü 83 dargestellt. Dieser Effekt ist auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen worden [173], eine mögliche Ursache könnte ein späteres Blockieren der Bindungsstelle durch die Substanz selbst oder durch allosterische Effekte ausgelöst sein.

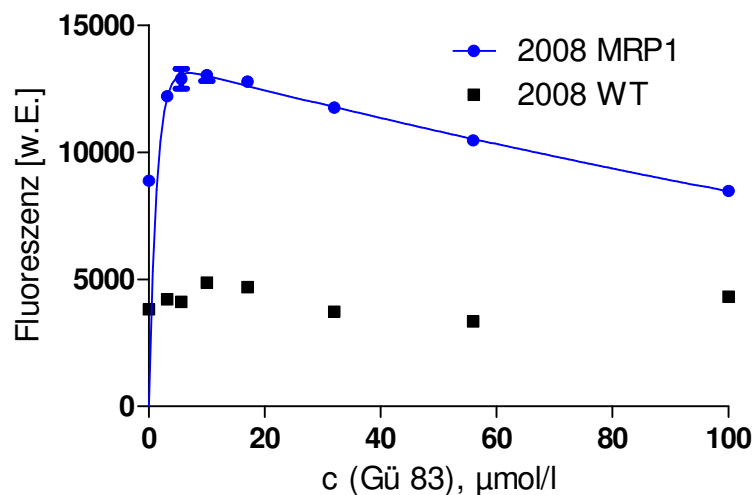


Abbildung 74: Dosis-Wirkungskurve von Gü 83 in einer linearen Auftragungsweise. In dieser wird besonders die spätere Abnahme des Glutathion-Effluxes deutlich. Darstellung eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Bis jetzt sind noch keine generellen Struktureigenschaften der Verbindungen bekannt, von denen aus auf einen erhöhten Glutathion-Efflux geschlossen werden kann [173]. Verapamil und die von Leslie et al. untersuchten Flavonoide weisen kaum gemeinsame Strukturmerkmale auf (siehe auch Abbildung 75).

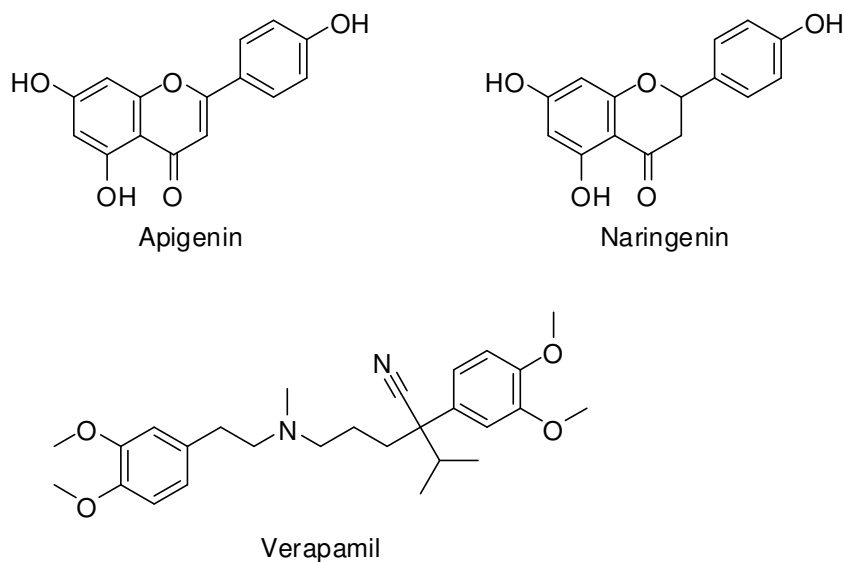


Abbildung 75: Strukturformeln einiger den Glutathion-Efflux steigernder Substanzen.

Allen gemein ist nur die Tatsache, dass sie nicht aktiv von MRP1 transportiert werden [127, 175]. Im Jahr 2001 veröffentlichten Leslie et al. strukturelle Voraussetzungen für die Interaktion von Flavonoiden mit MRP1 und konnten demonstrieren, dass die Lipophilie eine entscheidende Rolle spielt [176]. Jedoch zeigten die beiden sehr strukturverwandten Flavonoide Apigenin und Naringenin, die sich nur in einer Doppelbindung unterscheiden, in einer Veröffentlichung ebenfalls von Leslie et al. aus dem Jahr 2003 stark unterschiedliche Effekte auf den Glutathion-Transport [173]. Während Apigenin diesen um den Faktor vier verstärkte, kam es beim Naringenin nur zu einer Verdoppelung. Dies weist darauf hin, dass die Lipophilie alleine nicht ausreicht, um die Steigerung der Transportrate von Glutathion durch einen Modulator zu beschreiben und es noch weitere, bis jetzt unbekannte Gründe dafür geben muss.

Da die auf ihre Glutathion-Efflux steigernden Eigenschaften untersuchten Verbindungen in dieser Arbeit keinen signifikanten Effekte auf die Transportrate des Glutathions demonstrieren, konnten keine neuen Erkenntnisse für die strukturellen Voraussetzungen gewonnen werden.

4.10 MRP2 in der Cisplatinresistenz

Ziel dieser Versuchsreihen war es die durch MRP2 induzierte Cisplatinresistenz in MDCKII MRP2 Zelllinien zu charakterisieren und einige offene Fragestellungen aus der Literatur, wie dem Einfluss des Glutathions auf die Cisplatinresistenz, zu untersuchen.

4.10.1 MTT-Assay

Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben einen Zusammenhang zwischen der MRP2 Expression und der Cisplatinresistenz [106, 107, 166, 177]. Um diesen Zusammenhang zu charakterisieren wurde zunächst mittels MTT-Assay überprüft, ob eine Resistenz von MRP2 überexprimierenden Zellen gegenüber diesem Agens besteht. In Abbildung 76 sind die Dosis-Wirkungskurven für MDCKII und für die zugehörige, transfizierte Zelllinie MDCKII MRP2 dargestellt.

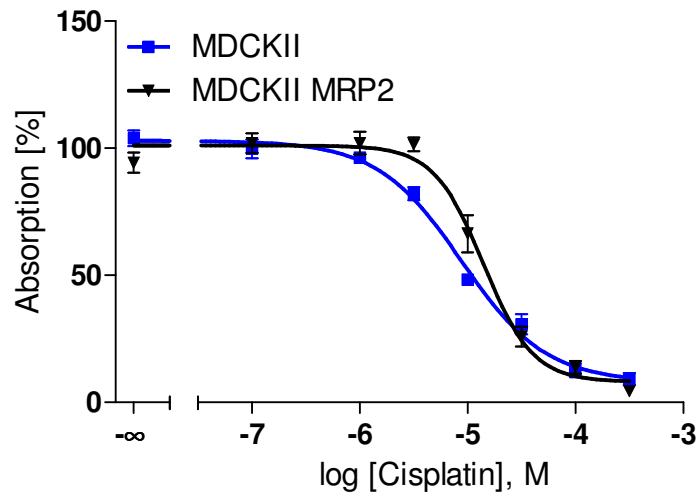


Abbildung 76: MTT-Assay von MDCKII MRP2 und MDCKII gegenüber Cisplatin. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung von $n=3$ Experimenten jeweils als Dreifachbestimmung nach Normalisierung.

Es ist zu erkennen, dass die Kurve für die transfigurierte Zelllinie eine leichte Rechtsverschiebung aufweist. Dies deutet auf eine Resistenz der MRP2-Variante gegenüber den MDCKII Zellen hin. Die IC_{50} für den Wildtyp ist $8,866 \mu\text{mol/l}$, während sie für die MDCKII MRP2 Zelllinie $14,03 \mu\text{mol/l}$ beträgt. Der Resistenzfaktor Rf wurde mit Gleichung 14 berechnet, und ergab für diese Zellpaarung einen Rf von ungefähr 1,6.

Gleichung 14

$$Rf = \frac{IC_{50}(\text{resistent})}{IC_{50}(\text{sensitiv})}$$

4.10.2 Cisplatin-Uptake

Um zu testen, ob und in welchem Ausmaß dies auf einen reduzierten Cisplatin-Uptake zurückzuführen ist, wurde die Platinaufnahme in die Zelle über die Zeit gemessen. Die hier vorgestellte Methode wurde bereits von Frau Dr. Pieck an der Universität Bonn etabliert [178]. Als fixe Konzentration für Cisplatin wurde $100 \mu\text{mol/l}$ gewählt, die zwar sehr hoch ist, aber schon in anderen Veröffentlichungen verwendet wurde [179].

Die Messung des Platingehalts erfolge mit Hilfe der Atom-Absorptionsspektroskopie. Um Präzision und Richtigkeit der Messung zu gewährleisten wurden Qualitätskontrollproben mit vermessen. Diese durften nicht mehr als 10 % vom nominalen Wert abweichen, im Fall des kleinsten Wertes nicht mehr als 15 %. Wichen die Werte stärker ab, wurde der Lauf abge-

brochen und die Messung wiederholt. In Tabelle 44 sind die Ergebnisse aller PQC Proben mit Standardabweichung angegeben. Kein Wert wich mehr als 10 % vom Nominalwert ab, sodass die Kriterien für Präzision und Richtigkeit erfüllt waren.

Tabelle 44: Mittelwert, Standardabweichung und relativer Fehler aller PQC-Proben.

PQC-Probe [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]	StAbw. [ng/ml]	Rel. Fehler [%]
10	10,39	0,15	3,90
20	20,96	0,98	4,48
40	42,16	1,08	5,39

In Abbildung 77 ist die Cisplatin Aufnahme über die Zeit in beiden Zelllinien dargestellt. Je länger die Inkubationszeit war desto stärker stieg auch die intrazelluläre Platin Konzentration linear an. Die ermittelten Werte für den Platingehalt innerhalb der Zelle wurden zusätzlich auf den ermittelten Gesamtproteingehalt bezogen, um mögliche Schwankungen z.B. durch unvollständiges Ablösen der Zellen zu minimieren. Die Proteinbestimmung erfolgte hierbei nach der in Kapitel 3.9.2 beschriebenen Methode nach Bradford.

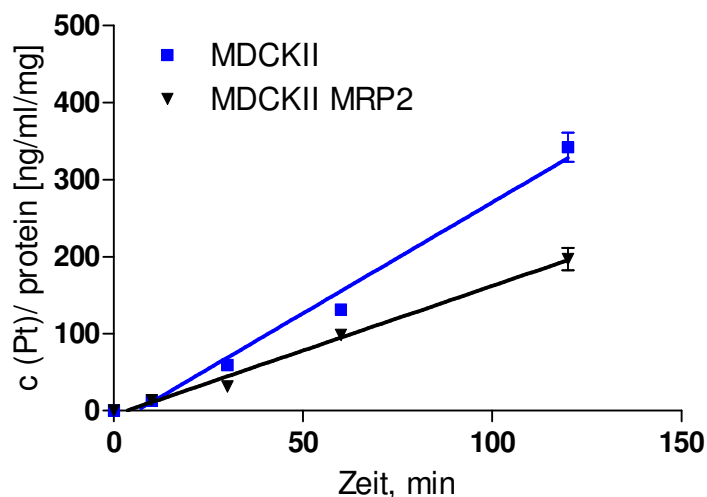


Abbildung 77: Platinaufnahme der Zelllinien MDCKII MRP2 und MDCKII WT über die Zeit. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Auffällig ist, dass in die transfizierte Zelle deutlich weniger Platin aufgenommen wurde als in die sensitive. Dies lässt auf eine Beteiligung von MRP2 in der Cisplatinresistenz schließen.

Wenn nur MRP2 für die Resistenz gegenüber Cisplatin in den transfizierten Zellen verantwortlich ist, sollte die Aufnahme von Platin in die MDCKII MRP2 Zelle um den gleichen Faktor niedriger sein wie der Resistenzfaktor.

Werden die Steigungen der beiden Geraden verglichen und ins Verhältnis zueinander (Steigung WT $2,676 \pm 0,160$ zu Steigung MRP2 $1,611 \pm 0,064$) gesetzt, so wird ein Quotient von 1,661 und damit den Unterschied zwischen den beiden Geraden erhalten. Dieser Unterschied entspricht ungefähr dem Resistenzfaktor, der für Cisplatin in dieser Zellpaarung ermittelt wurde (vergl. Kapitel 4.10.1). Dies ist somit ein weiteres Indiz dafür, dass der hier gemessene Unterschied auf MRP2 zurückzuführen ist.

Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wurde zusätzlich der Einfluss von Indometacin auf den Cisplatin-Uptake der beiden Zelllinien untersucht. Indometacin ist ein bekannter Inhibitor für MRP2 und müsste somit in der Lage sein, den durch MRP2 induzierten Unterschied in den beiden Zelllinien aufzuheben. Indometacin wurde in einer Konzentration von $200 \mu\text{mol/l}$ zugesetzt. Diese Konzentration entspricht in etwa der IC_{50} im zuvor beschriebenen funktionellen Assay (Vergl. Kap. 4.3.5) und wurde auch von anderen Arbeitsgruppen zur Inhibition von MRP2 eingesetzt [117, 180, 181]. In Abbildung 78 ist der Effekt von Indometacin auf die Cisplatin-Aufnahme im Vergleich zum Versuch ohne Inhibitor dargestellt.

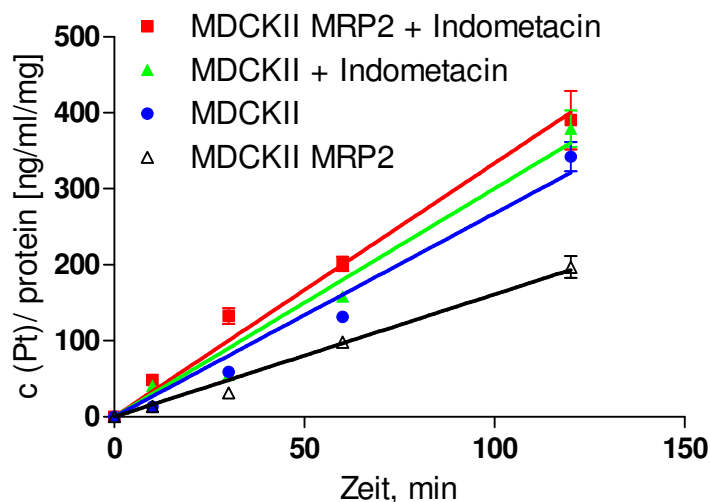


Abbildung 78: Cisplatinaufnahme über die Zeit in An- und Abwesenheit des MRP2 Inhibitors Indometacin. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Es ist ein deutlicher Anstieg der Cisplatinakkumulation in der Zelle besonders bei der MDCKII MRP2 Zelllinie zu beobachten. In der Wildtypzelllinie ist ebenfalls ein leichter Anstieg der intrazellulären Platinkonzentration sichtbar, der aber deutlich geringer ausfällt. Da dieser Effekt auch im Calcein-AM-Assay vorhanden ist und in einer Nierenzelllinie wie in Kapitel 4.1 schon erwähnt auch natürlicherweise schon selber MRP2 exprimiert wird [112], ist dies wahrscheinlich auf das canine MRP2 zurückzuführen. In den Abbildung 79 wird gezeigt, dass die Platinkonzentrationen im Wildtyp mit und ohne Zusatz von Indometacin untereinander nicht signifikant verschieden sind. Auch im Vergleich zum Gehalt der MDCKII MRP2 mit Indometacin konnte keine signifikante Abweichung beobachtet werden. Indometacin ist also in der Lage, den durch MRP2 induzierten Unterschied bei einer Konzentration von 200 $\mu\text{mol/l}$ vollständig aufzuheben. Die benötigte Konzentration an Indometacin ist jedoch so hoch, dass sie *in vivo* wahrscheinlich toxische Reaktionen auslösen würde und kann daher nicht zur unterstützenden Therapie bei MRP2-induzierter Cisplatinresistenz eingesetzt werden kann.

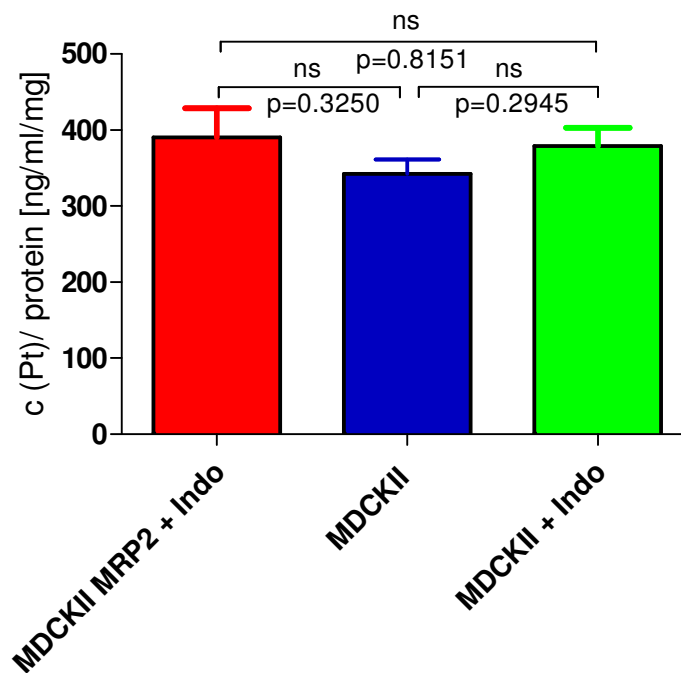


Abbildung 79: Platingehalt der Zellen in ng/ml pro mg Gesamtprotein zum Zeitpunkt 120 min. Der t-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede in den Platinkonzentrationen. ns = nicht signifikant.

4.10.3 Cisplatin Uptake in Kombination mit BSO

In einigen Veröffentlichungen wird die Exkretion von Cisplatin über eine Kopplung an Glutathion beschrieben. Diese Konjugate könnten dann über eine sogenannte GS-X-Pumpe (Glutathion-Konjugat-Pumpe) aus der Zelle hinaus transportiert werden. MRP2 soll eine solche GS-

X-Pumpe darstellen [177]. Um den Einfluss des Glutathions auf die Exkretion von Cisplatin zu untersuchen, wurde eine 48stündige Vorinkubation der Zellen mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Buthionsulfoxime (BSO) durchgeführt. BSO ist ein selektiver Blocker der Glutathionsynthese und senkt gleichzeitig die Glutathion-S-Transferase Ablesung an der DNA, sowie deren Aktivität selber und wird daher eingesetzt, um den Glutathionmangel-Phänotyp zu simulieren [182, 183]. Um die Glutathion-Level in den Zellen zu senken wurde sich an der Durchführung von Fruehauf et al. orientiert, die 100 $\mu\text{mol/l}$ für 12 -72 h einsetzten. Nach 24 h konnten sie so die Glutathionlevel um bis zu 95 % senken [184].

Zunächst wurde überprüft, ob das BSO in dieser Versuchsanordnung in der Lage ist, die Glutathionmenge intrazellulär so stark zu erniedrigen, dass mit Effekten auf den Cisplatin-Efflux zu rechnen wäre. Dazu wurden die Zellen über 48 h mit BSO inkubiert und nach der in Kapitel 3.16.4 beschriebenen Vorschrift lysiert und im Anschluss daran der Glutathiongehalt gemessen. In Abbildung 80 sind die Ergebnisse der intrazellulären Glutathionbestimmung dargestellt.

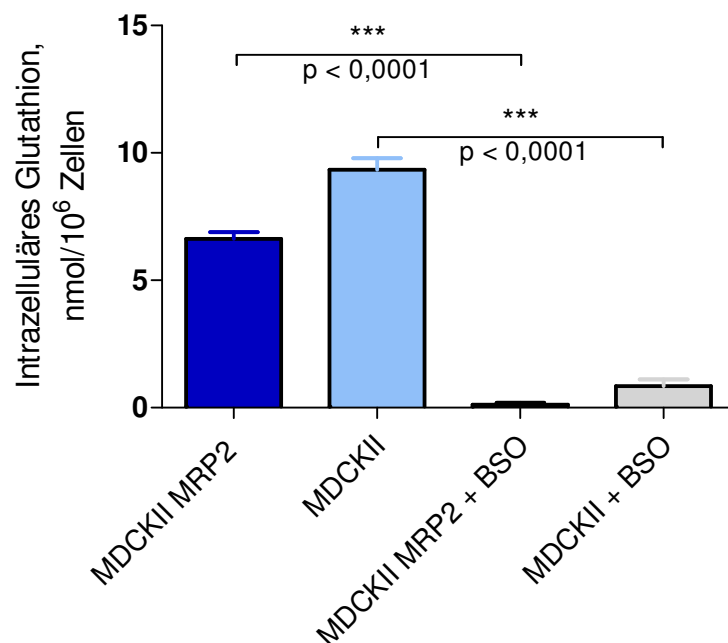


Abbildung 80: Intrazelluläres Glutathion-Level pro 1 Millionen Zellen vor und nach Inkubation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ BSO über 48 h. Die Unterschiede in den Glutathionspiegeln sind mit $p < 0,0001$ signifikant unterschiedlich in den behandelten und unbehandelten Zellen ($n \geq 3$).

Aus dieser Abbildung wird deutlich, dass durch die Zugabe von BSO der intrazelluläre GSH-Level signifikant gesenkt werden konnte und somit eigentlich ein Effekt durch das Wegfallen der Konjugatbildung mit Cisplatin beim Uptake erkennbar sein sollte.

Als nächster Schritt wurde nun der Effekt des Glutathionmangels auf den Cisplatin-Uptake untersucht. Auch hier wurden beide Zelllinien mit 100 $\mu\text{mol/l}$ BSO über 48 h vorbehandelt. In Abbildung 81 ist der Effekt des durch BSO ausgelösten Glutathionmangels auf die Cisplatinaufnahme im Vergleich zu den unbehandelten Zellen dargestellt.

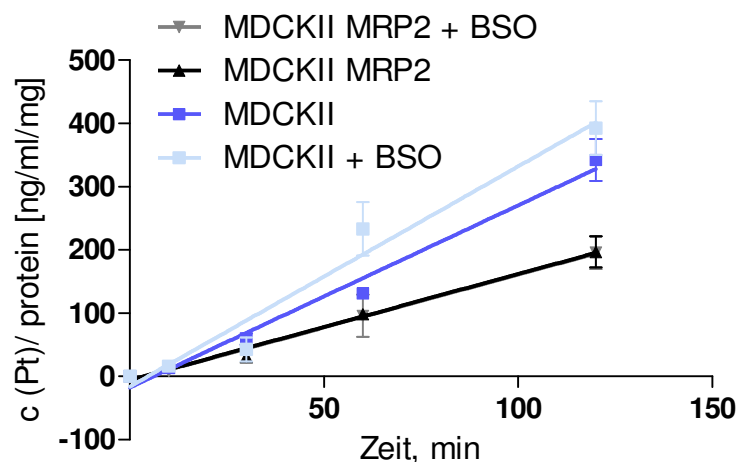


Abbildung 81: Effekt des BSO induzierten Glutathionmangels auf die Aufnahme von Cisplatin, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Zu erwarten wäre eine Aufhebung der Resistenz ähnlich wie bei den Versuchen mit Indometacin, wenn Cisplatin wirklich als Glutathionkonjugat transportiert wird. Durch das fast vollständige Fehlen des Glutathions in der Zelle könnten auch nur weniger oder keine Konjugate gebildet und dem entsprechend auch transportiert werden. In diesen Versuchen ergab die Auswertung jedoch ein anderes Bild. Sowohl für die MRP2 transfizierte Zelllinie als auch für die Wildtyp-Zelllinie konnte keine signifikante Veränderung in der Cisplatin-Akkumulation festgestellt werden (vergl. Abbildung 82). Aus diesem Ergebnis kann abgeleitet werden, dass Glutathion keinen Einfluss auf die Cisplatin-Exkretion zumindest bei Kurzzeit Exposition bis zwei Stunden besitzt.

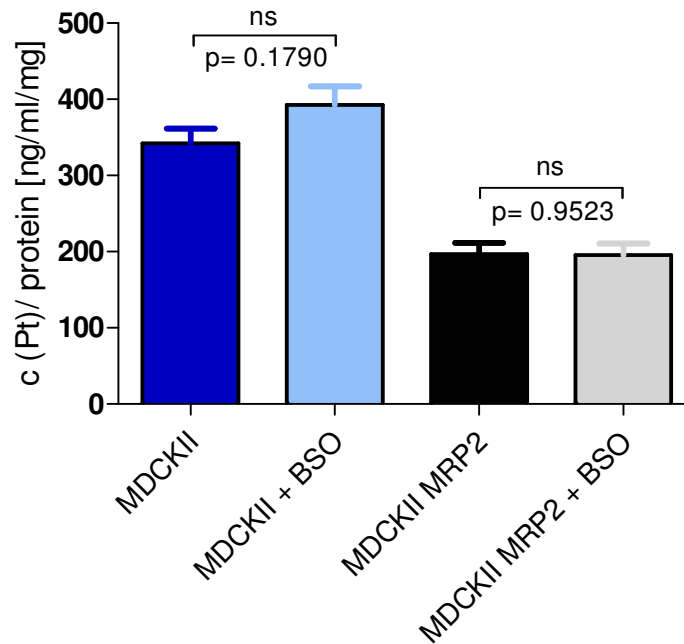


Abbildung 82: Platingehalt der Zellen in ng/ml pro mg Gesamtprotein zum Zeitpunkt 120 min. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den unbehandelten und behandelten Zellpaarungen. ns = nicht signifikant.

Um zeigen zu können, dass Cisplatin ebenfalls keinen Einfluss auf den Efflux von Glutathion besitzt und damit die Ergebnisse der Experimente mit BSO zu verifizieren, wurden, wie in Kapitel 3.16.5 beschrieben, Versuche zum Glutathion-Efflux in Kombination mit Cisplatin durchgeführt. In Abbildung 83 ist ein typisches Experiment des Glutathion-Effluxes abgebildet. Wie erwartet ist der Efflux an Glutathion in der MRP2 transfizierten MDCKII MRP2 Zelllinie höher als im Wildtyp, da MRP2 ebenfalls wie MRP1 in der Lage ist Glutathion zu transportieren [89, 185]. Sowohl im Wildtyp als auch in der MRP2 transfizierten Zelllinie kommt es bei hohen Konzentrationen von Cisplatin zu einer leichten Verringerung des Glutathion-Effluxes.

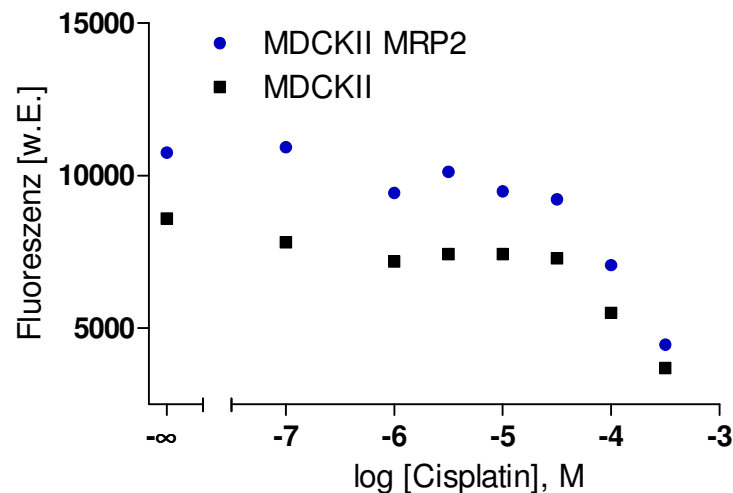


Abbildung 83: Glutathion Efflux in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen Cisplatin. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung.

Um herauszufinden, ob diese Reduzierung des Glutathion-Effluxes ein MRP2 induziertes Phänomen darstellt oder in beiden Zelllinien gleich ausgeprägt war, wurden die Ergebnisse in Prozent ausgehend von der Kontrolle ohne Cisplatin umgerechnet.

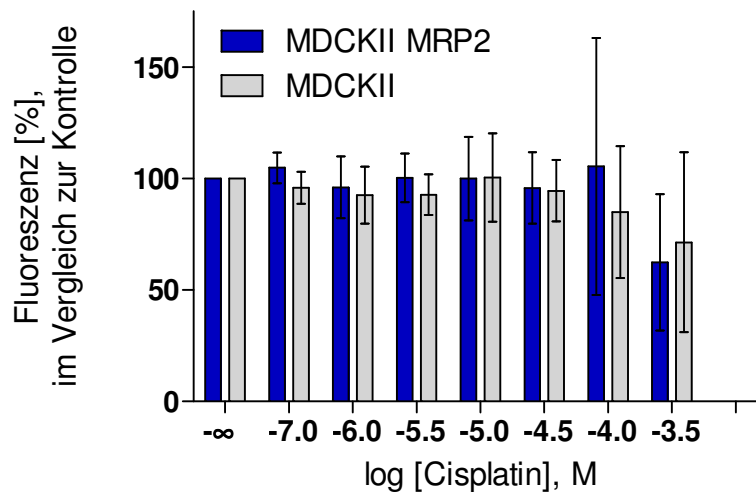


Abbildung 84: Prozentualer Glutathion Efflux aus MDCKII Zelllinien im Prozent von der Kontrolle ohne Cisplatin. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 84 graphisch zusammengestellt. Mit steigender Cisplatinkonzentration nimmt die Streuung deutlich zu, was auf toxische Effekte zurückzuführen sein könnte. Es gibt aber keinen signifikanten Unterschied im Glutathion-Efflux der

beiden Zelllinien, sodass daraus geschlossen werden kann, dass MRP2 keinen Einfluss auf den GSH-Efflux besitzt. Es gibt mehrere Veröffentlichungen, die die Rolle des Glutathions, bei der Detoxifikation des Cisplatins über MRP2 schon in Frage gestellt haben [171, 186].

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Glutathion wahrscheinlich nicht am Transport von Cisplatin beteiligt ist oder zumindest nicht dafür benötigt wird. Unterstützt wird diese These durch eine neue Untersuchung von Wortelboer et al. mit MRP1 und MRP2 transfizierten Zellen, die ebenfalls keinen Einfluss von Glutathion auf die MRP2- induzierte Cisplatinresistenz feststellen konnten [171].

4.10.4 Zusammenfassung MRP2 in der Cisplatinresistenz

Es konnte gezeigt werden, dass MRP2 eine Rolle in der Cisplatinresistenz spielt, da der ermittelte Resistenzfaktor aus dem MTT-Assay und der Unterschied in der Steigung der Geraden aus den Uptake-Versuchen nahezu identisch sind. Durch Modifikation des Uptakeassays durch Zugabe von Indometacin, konnte belegt werden, dass Indometacin in der Lage ist die MRP2 induzierte Cisplatinresistenz aufzuheben, während eine Verminderung des intrazellulären Glutathions durch BSO keinen Einfluss zeigte.

Die eingesetzte AAS-Methode inklusive Modifikationen ist dazu geeignet MRP2 induzierte Cisplatinresistenzen zu untersuchen und kann ein Werkzeug sein, neue Inhibitoren zu charakterisieren.

4.11 Kombinationsassays zur Charakterisierung des Bindungsverhalten an MRP2

Durch die durchgeführten Kombinationsassays sollen die Interaktionen zwischen den eingesetzten Verbindungen charakterisiert und damit auch Rückschlüsse auf eventuell unterschiedliche Bindungsstellen gezogen werden. Aus diesen Gründen wurden Kombinationsexperimente an MRP2 durchgeführt.

Grundsätzlich wurde immer eine den Calcein-AM-Austransport aktivierende Substanz (z.B. E₂17G oder eine Gü-Verbindung; vergl. Kapitel 4.6.4) mit einem bekannten oder neuen Inhibitor (aus dieser Arbeit) kombiniert. Während Aktivator (*A*) und Inhibitor (*I*) in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wurden, war die Calcein-AM Konzentration (Substrat (*S*)) konstant.

Tabelle 45: Darstellung der durchgeführten Kombinationsassays im Calcein-AM-Assay für MRP2

Aktivator	Inhibitor	Shift der Dosis-Wirkungskurve
E ₂ 17G	Indometacin	Nein
E ₂ 17G	LM 20.7	Ja
E ₂ 17G	LM 20.8	Ja
Gü 658	LM 20.8	Ja
Gü 658	Indometacin	Nein
Gü 658	Gü 83	Nein
Indometacin	Gü 83	Nein

Die Ergebnisse ließen sich grundsätzlich in zwei Kategorien einordnen. Zum Einen gab es Kurven, bei denen ein Rechtsshift der Kurven zu beobachten war und zum Anderen Kurven ohne Shift. In Tabelle 45 sind die verwendeten Kombinationen mit Angabe eines evtl. auftretenden Shifts aufgeführt. Die Verwendung von Indometacin als Aktivator beruht auf Beobachtungen in Assays, in denen es zu Beginn der Messung ebenfalls zum Abfall der intrazellulären Fluoreszenz kommt. In Abbildung 85 ist beispielhaft eine vollständige Kurve von Indometacin aufgetragen. Im Mittel betrug die EC_{50} für die Aktivierung von Indometacin $19,46 \pm 9,05 \mu\text{mol/l}$. In der Literatur ist Indometacin sowohl als Inhibitor [129] als auch als Aktivator [147] beschrieben.

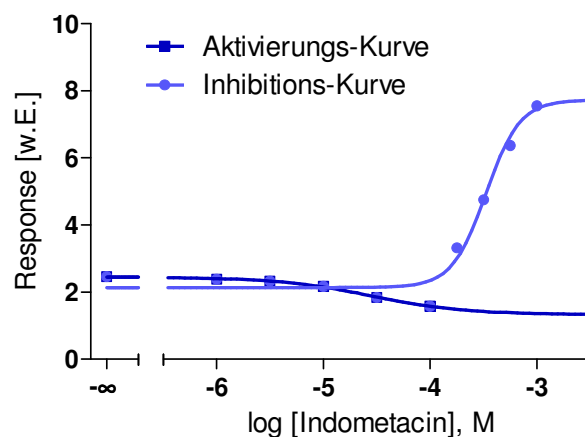


Abbildung 85: Aktivierungs- und Inhibitionskurve für Indometacin im Calcein-AM-Assay für MRP2. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n > 3$ unabhängigen Experimenten. Der Hill-Koeffizient der Aktivatorkurve ist 1, während die Inhibitor-Kurve einen Hillkoeffizienten von 2,117 hat.

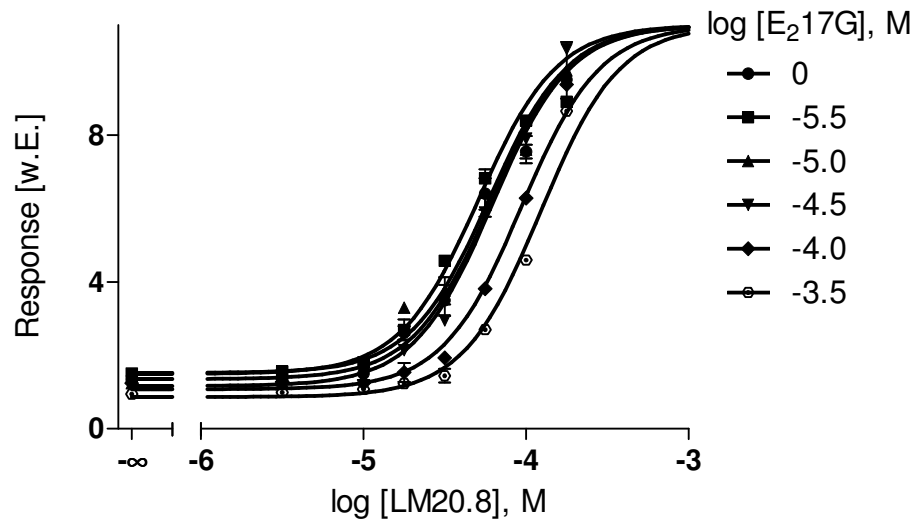


Abbildung 86: Typisches Experiment mit als Doppelbestimmung eines Kombinations-Assays mit E₂17G und LM 20.8. Mit zunehmender Aktivator-Konzentration kommt es zur Rechtsverschiebung der Inhibitions-Kurven.

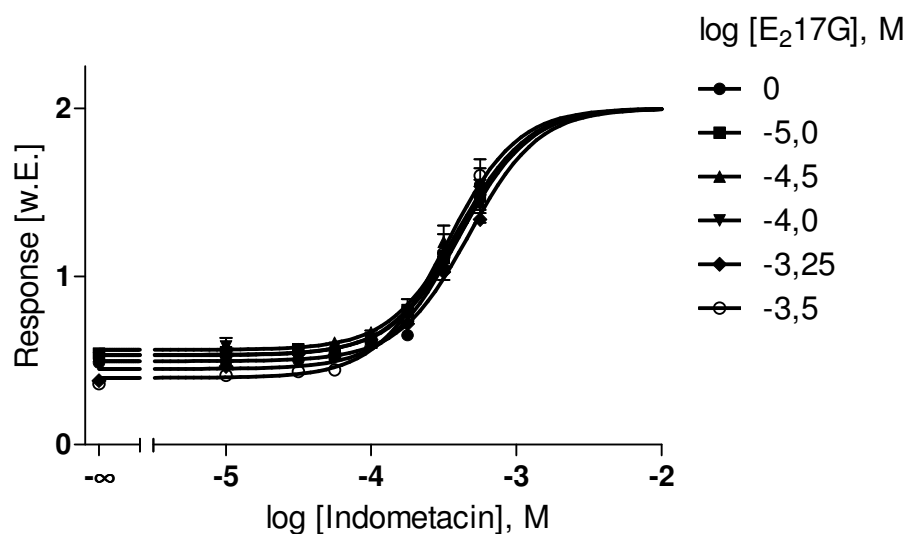


Abbildung 87: Typisches Experiment als Doppelbestimmung eines Kombinations-Assays mit E₂17G und Indometacin. Trotz zunehmender Aktivator-Konzentration kommt es zu fast keiner Verschiebung der Inhibitions-Kurven.

In Abbildung 86 sind am Beispiel von E₂17G und LM 20.8 ein Beispiel für Kurvenverläufe mit Rechtsverschiebung und in Abbildung 87 am Beispiel der Kombination von Indometacin mit E₂17G Kurvenverläufe ohne Veränderung abgebildet.

4.11.1 Dose-Ratio-Auswertung

Die Dose-Ratio-Auswertung DR ist eine Methode, die Allosterie von Bindungsstellen in Bindungsexperimenten zu charakterisieren. Sie setzt die IC_{50} -Werte in Anwesenheit des Allosters ins Verhältnis zum IC_{50} -Wert ohne Alloster wie in Gleichung 15 dargestellt.

Gleichung 15

$$DR = \frac{IC_{50} \text{ (in Anwesenheit des Allosters)}}{IC_{50} \text{ (ohne Alloster)}}$$

Durch Auftragen der reziproken DR -Werte gegen die logarithmische Konzentration des Allosters (in diesem Fall des Aktivators) werden Dosis-Wirkungskurven erhalten. Der aus der sigmoidal verlaufenden Kurve berechnete pEC_{50} -Wert, soll dann der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des Allosters entsprechen [187]. In Abbildung 88 sind beispielhaft die Dose-Ratio-Auswertungen für die rechtsverschobenen Kurvenscharen dargestellt. Für Kurvenscharen aus der Kombination von z.B. Indometacin und E₂17G ist diese Auswertungsmethode nicht geeignet, da es dort zu keiner deutlichen Änderung der IC_{50} -Werte kommt. Abbildung 88 zeigt für jede Kombination einen ähnlichen Kurvenverlauf und die gleichen pEC_{50} -Werte wie für die entsprechenden Aktivatorkurven alleine (siehe Tabelle 46). Dies zeigt, dass die anteilige Verschiebung ausgedrückt durch die Dose Ratio auf die Erhöhung der Konzentration des Aktivators zurückzuführen ist.

Tabelle 46: Vergleich der pEC_{50} -Werte aus der Dose-Ratio-Auswertung mit der pEC_{50} des entsprechenden Aktivators alleine. Die pEC_{50} -Werte sind nicht signifikant verschieden ($p > 0,05$).

Kombination	pEC_{50} Dose-Ratio	pEC_{50} (Aktivator allein)
E ₂ 17G / LM 20.8	$3,953 \pm 0,144$	$3,938 \pm 0,156$ (E ₂ 17G)
E ₂ 17G / LM 20.7	$3,882 \pm 0,262$	$3,938 \pm 0,156$ (E ₂ 17G)
Gü 658 / LM 20.8	$5,128 \pm 0,225$	$5,436 \pm 0,236$ (Gü 658)

Dennoch kann aus der DR abgeleitet werden, dass die Rechtsverschiebung der Kurvenscharen (vergl. Abbildung 86) durch den Aktivator ausgelöst ist und dass zur Aufhebung dieses Effektes eine entsprechende Erhöhung der Konzentration des Inhibitors nötig ist. Dies würde eher einem kompetitiven Verhalten nahe kommen als einer Allosterie. Die Dose-Ratio-Auswertung ist

demnach nicht geeignet das Verhalten eines Dreikomponentensystems bestehend aus einem Inhibitor, Aktivator und einem konstanten Substrat zu charakterisieren.

Da aber eine Art kompetitives Verhalten zwischen Aktivator und Inhibitor festgestellt werden konnte, wurde zusätzlich versucht eine enzymkinetische Auswertung vorzunehmen, um dieses Verhalten abzusichern (Kapitel 4.11.3).

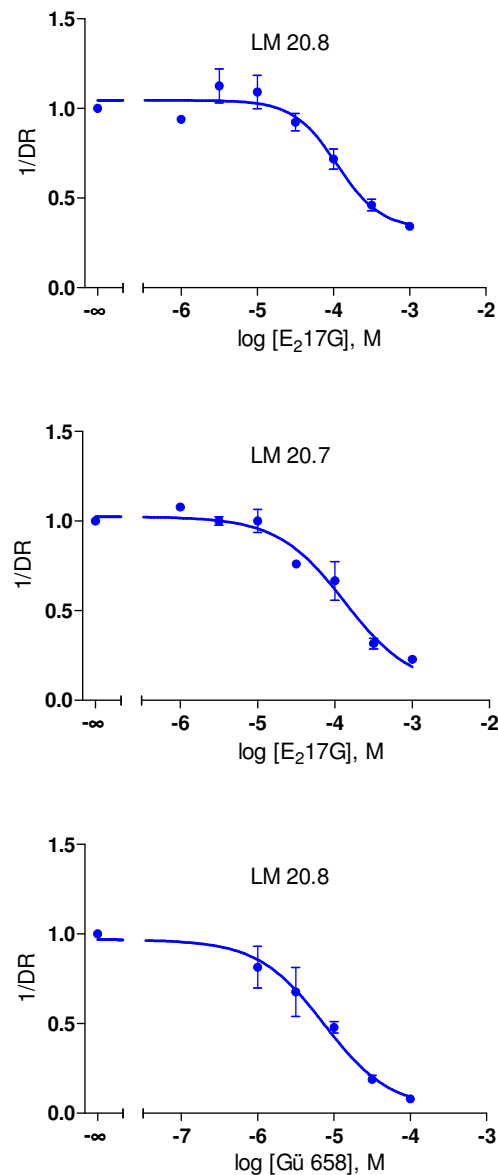


Abbildung 88: Dose-Ratio-Auswertung verschiedener Kombinationsassays durchgeführt in MRP2 transfizierten MDCKII-Zellen. Die Dose-Ratio-Kurven entsprechen im Wesentlichen den Aktivator-Kurven des verwendeten Aktivators. Abgebildet sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von $n = 3$ unabhängigen Versuchen.

4.11.2 Aufklärung der Anzahl interagierender Bindungsstellen im Dixon-Plot

Grundlage dieser Auswertung bildet die Annahme, dass der Transportvorgang eines Transporters mit einer enzymatischen Reaktion vergleichbar ist [188]. Für die im Folgenden angewendeten Auswertungsmethoden war es nötig die erhaltenen Fluoreszenzwerte F in Geschwindigkeiten v umzurechnen. Dies erfolgte mittels Gleichung 16 [95]. Top stellt den maximalen Wert der Fluoreszenz dar.

Gleichung 16

$$v = Top - F$$

Beim Auftragen der Dixon-Plots für die Inhibitoren gegen die reziproke Geschwindigkeit, in Abhängigkeit von der Aktivatorkonzentration, zeigte sich bei allen verwendeten Inhibitoren ein parabelförmiger Kurvenverlauf. Die Auftragung nach Dixon erfolgte nach [189]. Durch Quadrierung der Inhibitor-Konzentrationen konnten die Parabeln in Geraden überführt werden (Abbildung 89). Dies stellt eine gängige Methode zur Bestimmung äquivalenter Bindungsstellen (n) dar [190]. In Abbildung 89 ist dies am Beispiel von LM 20.8 in Kombination mit E₂17G dargestellt, gilt aber analog für alle verwendeten Inhibitoren. Hinweise auf die Anzahl möglicher Bindungsstellen gibt der Hill-Koeffizient n_H , der das Maß der Kooperativität beschreibt. Dieser kann die Anzahl der interagierenden Untereinheiten (n) nicht überschreiten. Für die in dieser Arbeit verwendeten und im Calcein-AM-Assay für MRP2 identifizierten Inhibitoren liegt der Hill-Koeffizient im Mittel ungefähr bei zwei (vergl. Tabelle 30 und Tabelle 42). Zur weiteren Absicherung der These von zwei interagierenden Bindungsstellen wurden der Exponent der Inhibitor-Konzentration in den Dixon-Plots daher auf drei erhöht (was dementsprechend $n=3$ entspricht), wodurch Sättigungskurven erhalten wurden. Im Falle eines Exponenten von 1,2 blieben dagegen die Parabeln erhalten (Abbildung 90).

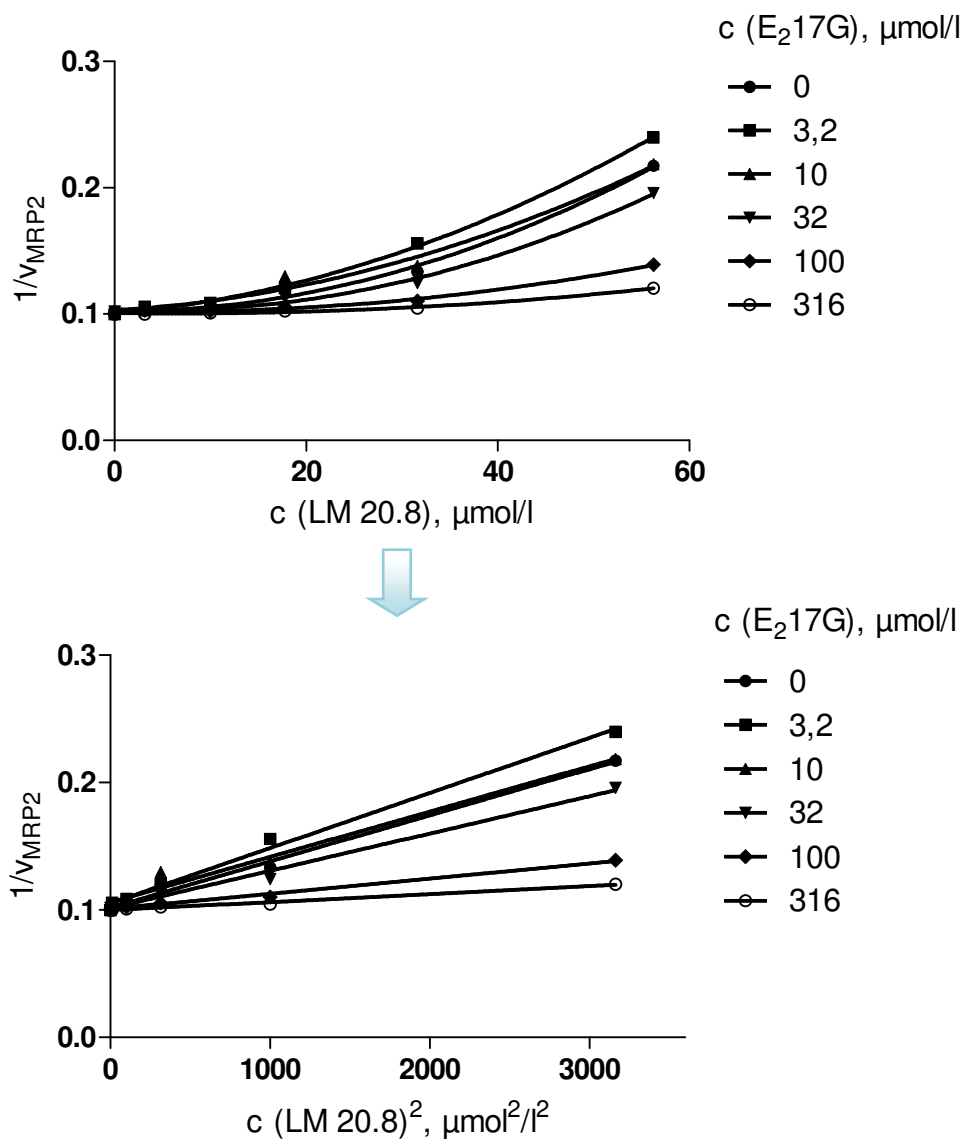


Abbildung 89: Dixon-Plots von LM 20.8 in Abhängigkeit von der E_{217G} -Konzentration. Oben: normale Auftragungsweise mit parabelförmigen Kurvenverlauf. Unten: Nach Quadrierung der LM 20.8 Konzentration entstehen Geraden. Abgebildet sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

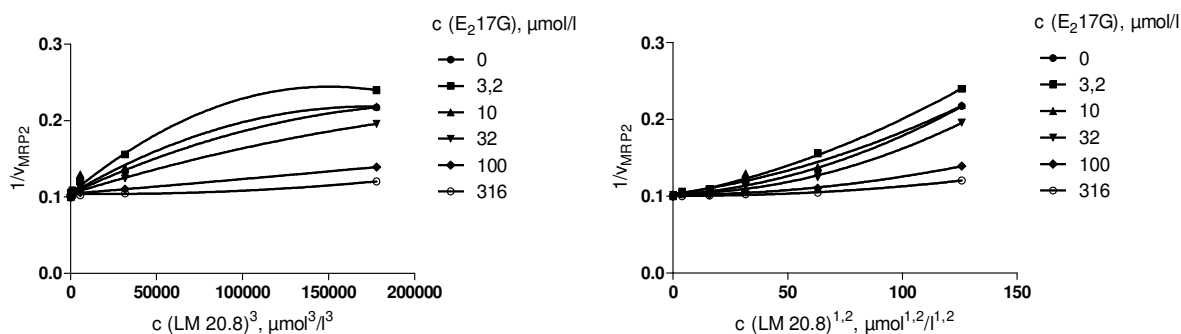


Abbildung 90: Zur Bestätigung das $n = 2$ wurden noch Dixon-Plots für $n = 3$ (links) und $n=1,2$ (rechts) erstellt. Während für $n = 3$ Sättigungskurven ermittelt wurden, blieb für $n = 1,2$ die Parabel erhalten.

Beim analogen Dixon-Plot für den Aktivator wurde ohne Quadrierung die beste Anpassung der Geraden erhalten ($n=1$). Jedoch hatten die Geraden eine durch die Aktivierung bedingte, umgekehrte Ausrichtung. Mit zunehmender Aktivator-Konzentration steigt die Pumpleistung und damit die maximale Geschwindigkeit v_{max} des MRP2 an. Bei reziproker Auftragungsweise ergibt sich ein Schnittpunkt im oberen rechten Quadranten des Koordinatensystems (Abbildung 91). Eine Verbesserung der Anpassung könnte wahrscheinlich mit einem Exponenten kleiner als eins erzielt werden (ca. zwischen 0,85-0,95). Jedoch wurde zur Vereinfachung eine ganze Bindungsstelle $n=1$ angenommen. Ähnliches gilt für die Inhibitoren, bei denen ein Exponent um die 1,8 zur besten Anpassung führen würde. Für die Inhibitoren wurde $n=2$ festgelegt.

Alle Aktivatoren besetzen demnach nur eine Bindungsstelle, während es bei den Inhibitoren immer zwei sind. MRP2 ist aus zwei homologen Transporterhälften aufgebaut, sodass schon der Aufbau des Transporters die Möglichkeit von zwei unterschiedlich affinen, aber dennoch sehr ähnlichen Bindungsregionen wahrscheinlich macht (Vergl. Abbildung 5). So konnten z.B. für Indometacin und andere nicht steroidale Antirheumatika in Experimenten zwei Bindungsstellen nachgewiesen werden, wobei eine hochaffin und die andere weniger affin war [191].

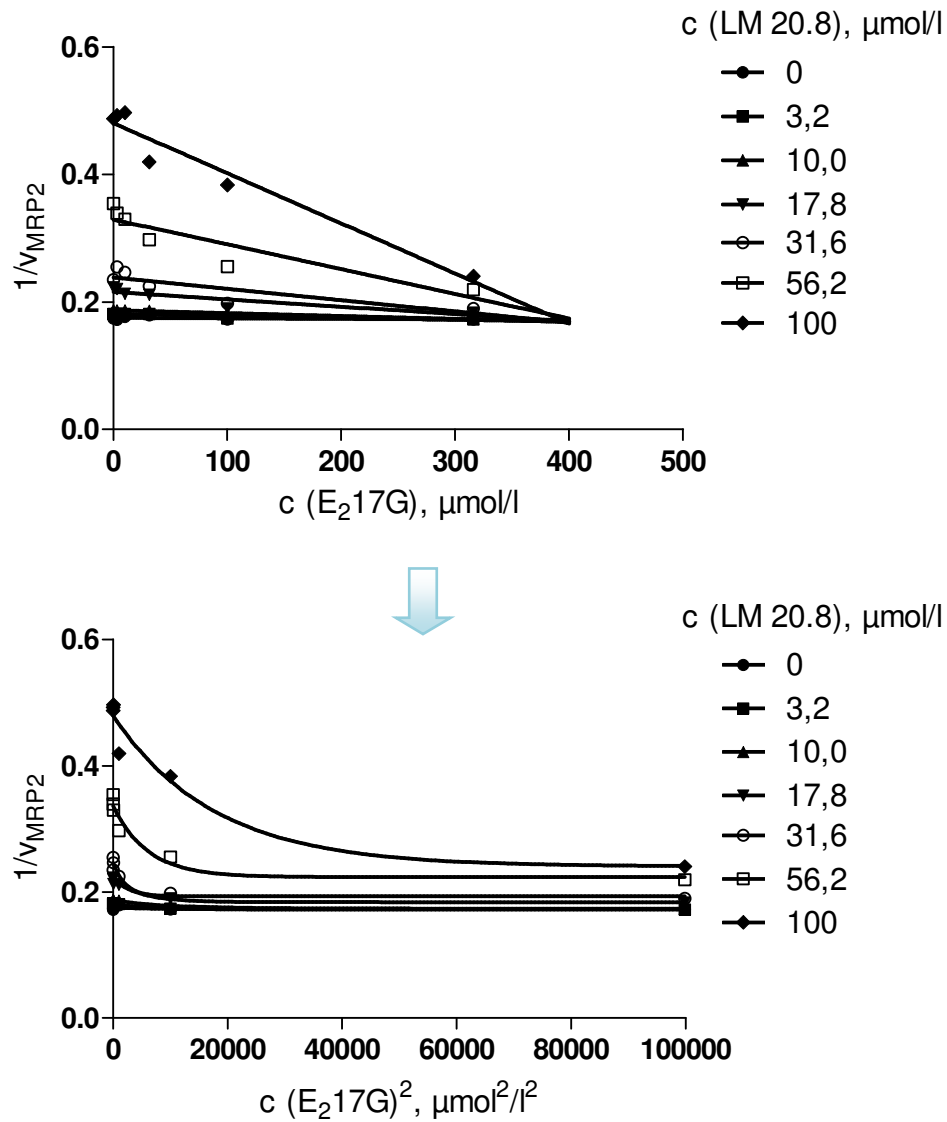


Abbildung 91: Dixon-Plot von E_217G in Abhängigkeit von der LM 20.8 Konzentration. Aufgrund der aktivierenden Wirkung des E_217G schneiden sich die Geraden im oberen rechten Quadranten des Koordinatensystems. Abgebildet ist der Mittelwert eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n \geq 3$ Wiederholungen. Oben Anzahl der Bindungsstellen $n = 1$ unten $n = 2$. Durch Quadrierung ergibt sich ein nicht linearer Verlauf.

4.11.3 Enzymkinetischer Auswertungsansatz

Bei diesem Auswertungsansatz sollen über die Interaktionen des Aktivators (A) und des Inhibitors (I) und die dadurch entstehenden Fluoreszenz- bzw. Geschwindigkeitsänderungen des Substrates (S) Rückschlüsse auf den Interaktionstyp des Aktivators mit dem Inhibitor gezogen werden. In Abbildung 92 sind alle möglichen Interaktionen zwischen den einzelnen Komponenten wiedergegeben. Aus dieser Abbildung wird deutlich, dass bei konstantem S alle Unterschiede im Transport, direkt oder indirekt auf die Interaktion zwischen A und I zurückzuführen sein müssten. Die Schritte beziehen sich auf die Durchführungsschritte des Kombinationsassays. Da jedoch gezeigt werden konnte, dass zusätzlich noch ein weiteres Molekül eines Inhibitors binden kann, ist selbst dieses Modell nicht ausreichend alle Interaktionen widerzuspiegeln. Außerdem ist nicht bekannt, ob und inwieweit überhaupt ein zweites Molekül bindet. Nach Tyers et al. besteht auch die Möglichkeit, dass ein Substratmolekül beim Transport mit mehreren Bindungsstellen nacheinander interagiert und so die Interaktion mit einem zweiten Substrat nur vorgetäuscht wird [192].

Das Modell der kinetischen Kooperativität wäre eine andere Möglichkeit, die mit dem Phänomen eines erhöhten Hill-Koeffizienten in Zusammenhang gebracht werden kann. Bei dieser Theorie wird von einer aktiven und einer inaktiven Enzymform ausgegangen. Im Grundzustand liegt das Enzym inaktiviert vor. Nur durch gelegentliche Spontanumwandlungen erreicht das Enzym die aktive Form. Das Substrat hat also die Möglichkeit mit zwei Enzymformen zu interagieren. Zu Beginn der Messung liegt das Enzym hauptsächlich inaktiviert vor durch Bindung des Substrates ändert sich die Form zu aktiviert. Bei wenig Substrat kann das Enzym in den Grundzustand zurückkehren. Wird die Substratkonzentration erhöht kann der Grundzustand nicht wieder erreicht werden. Am Ende liegen dann alle Enzyme in der aktivierten Form mit höchster Effizienz vor [135]. Besonders dieses Modell könnte auch auf die MRPs zutreffen, da für ihren Transportzyklus (siehe Abbildung 5, Kapitel 1.5.1) eine aktive und inaktive Transporterform angenommen wird.

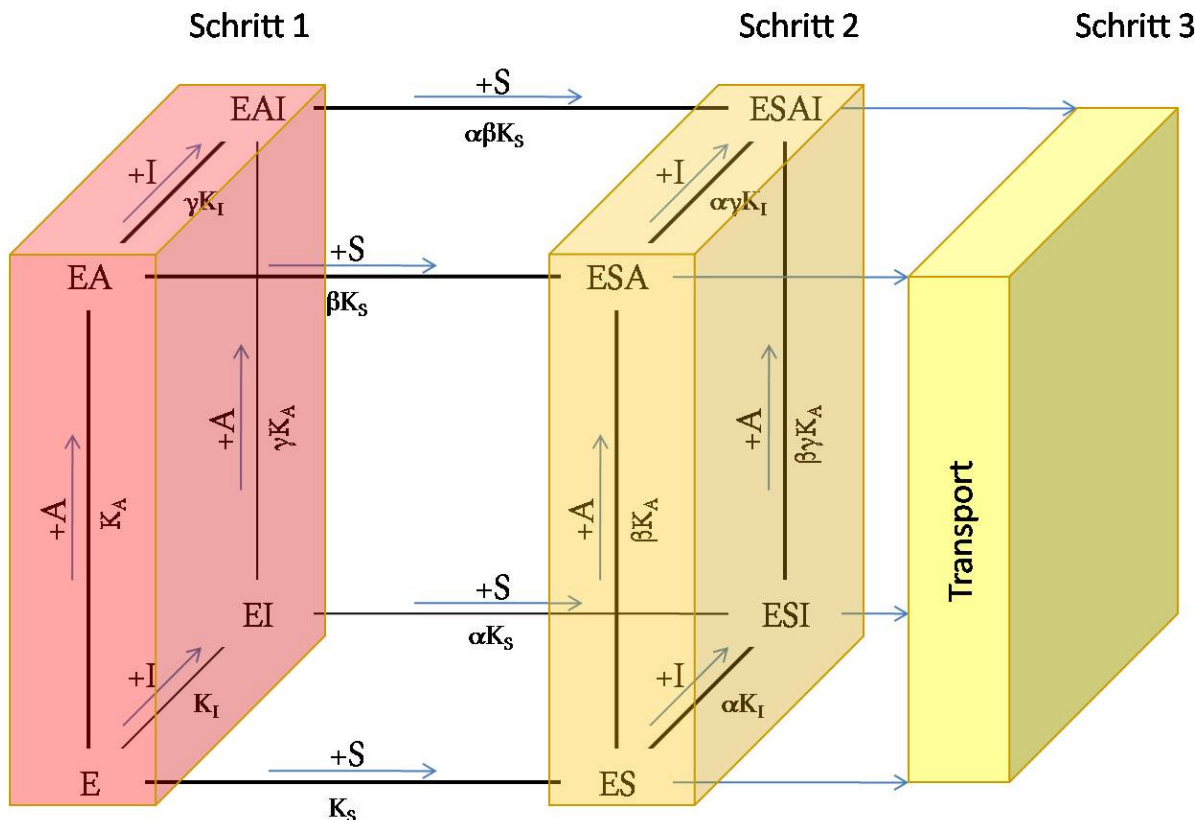


Abbildung 92: Alle möglichen Interaktionen zwischen einem Aktivator (A), einem Inhibitor (I) und einem Substrat (S) mit dem Transporter (E). Schritt 1: Einstellung des Gleichgewichts zwischen E, A und I. Schritt 2: Nach Zugabe von S wird die Transportgeschwindigkeit analog zum eingestellten Gleichgewicht in Schritt 1 verändert (Schritt 3). Modifiziert nach [193]. Das Modell ist jedoch nicht ausreichend das tatsächliche Interaktionsschema widerzuspiegeln.

Als Konsequenz daraus konnte keine mechanistische Auswertung durchgeführt werden. Durch eine phänomenologische Auswertung über die klassischen Inhibitionstypen sollte dennoch versucht werden Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten zu ziehen.

Grundsätzlich sind drei Grundtypen des Inhibitionsverhaltens bekannt: kompetitives, nicht-kompetitives und unkompetitives [193]. Bei der Konkurrenz konkurriert ein Modulator direkt mit einem Substrat um dieselbe Bindungsstelle. Bei nichtkompetitivem Verhalten bindet der Modulator an eine andere, aber mit der des Substrates interagierende Bindungsstelle. Bindet der Modulator wird die Bindungsstelle des Substrates so verändert, dass dieses nicht mehr binden oder transportiert werden kann. Durch Überschuss kann das Substrat den Modulator nicht verdrängen. Sonderformen des nichtkompetitiven Interaktionstyps sind die Mischtypen, bei denen die Kombination aus Substrat und Modulator noch katalytisch aktiv ist, d. h. es zu keiner vollständigen Inhibition kommt. Unkompetitive Interaktion bedeutet, dass der Modulator ausschließlich an den Enzymsubstrat-Komplex bindet [135]. Unkompetitives Bindungs-

verhalten ist sehr selten und kommt in dieser Versuchsanordnung wahrscheinlich gar nicht vor, da beide Effekte auch ohne die Kombination des Aktivators mit dem Inhibitor auftreten.

Die Auswertung erfolgte mittels der in GraphPad Prism[®] 5.01 implementierten Auswertungssoftware für Enzymkinetiken [110]. Dazu wurden die errechneten Geschwindigkeiten (v) gegen die Aktivator-Konzentrationen (A) in Abhängigkeit von der Inhibitor-Konzentration aufgetragen. Die zur Berechnung herangezogenen Gleichungen sind aus der GraphPad Prism[®] Dokumentation entnommen [110]. $[I]$ = Inhibitorkonzentration; K_m = Michaelis-Mentenkonstante ohne Inhibitor; K_i = Inhibitor-Konstante; v_{max} = Maximalgeschwindigkeit ohne Inhibitor; $[A]$ = Aktivatorkonzentration; v = Geschwindigkeit; α = Faktor, der angibt wie stark der Inhibitor die Affinität des Transporters gegenüber dem Aktivator ändert.

Für nichtkompetitiv gilt:

Gleichung 17

$$v_{max,[I]} = \frac{v_{max}}{(1 + \frac{[I]}{K_i})}$$

$$v = v_{max,[I]} * \frac{[A]}{(K_m + [A])}$$

Für kompetitiv gilt:

Gleichung 18

$$K_{m,obs} = K_m * (1 + \frac{[I]}{K_i})$$

$$v = v_{max} * \frac{[A]}{(K_{m,obs} + [A])}$$

Für Mischtyp-Inhibition gilt:

Gleichung 19

$$v_{max,App} = v_{max} / (1 + \frac{[I]}{(\alpha * K_i)})$$

$$K_{m,App} = K_m * \frac{(1 + \frac{[I]}{K_i})}{(1 + \frac{[I]}{\alpha * K_i})}$$

$$v = v_{max,App} * \frac{[A]}{(K_{m,App} + [A])}$$

Für unkompetitiv gilt:

Gleichung 20

$$v_{max,App} = \frac{v_{max}}{1 + \frac{[I]}{\alpha * K_i}}$$

$$K_{m,App} = \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{\alpha * K_i}}$$

$$v = \frac{v_{max,App} * [A]}{K_{m,App} + [A]}$$

Generell wurden auf die Abszisse immer die Aktivator-Konzentrationen aufgetragen, da normalerweise bei enzymkinetischen Auswertungen auf der Abszisse das Substrat aufgetragen wird und zumindest für E₂17G bekannt ist, dass es ein Substrat für MRP2 darstellt [146]. Durch eine vergleichende Analyse wurde dann das bevorzugte Modell ermittelt. Zur Entscheidung wurde die gleiche Sonderform des F-Tests angewendet, wie in Kapitel 3.17.2 für den Hill-Koeffizienten beschrieben. In Abbildung 93 und Abbildung 94 oben sind die berechneten Modelle für die nicht quadrierten Inhibitor-Konzentrationen und unten das entsprechende Modell mit den quadrierten Inhibitor-Konzentrationen dargestellt. Aus den Abbildungen wird deutlich, dass der Kurvenanpassung mit quadrierter Inhibitor-Konzentration deutlich besser ist. Die zusammengefasste Güte der Anpassung aller Kurven verbessert sich im Modell von E₂17G und Indometacin von R²=0,880 auf R²=0,971. Im Fall des Modells für Gü 658 und LM 20.7 erhöht sich nicht nur die Güte der Anpassung von R²=0,685 auf R²=0,952, sondern auch der Interaktionstyp ändert sich von nichtkompetitiv auf kompetitiv. Bei den nachfolgenden Auswertungen wurde für alle eingesetzten Inhibitoren immer der quadrierte Wert eingesetzt, was grundsätzlich zu besser angepassten Modellen führte. Dies verifiziert, das Modell der zwei Bindungsstellen aus dem Dixon-Plot (Kapitel 4.11.2) nochmals.

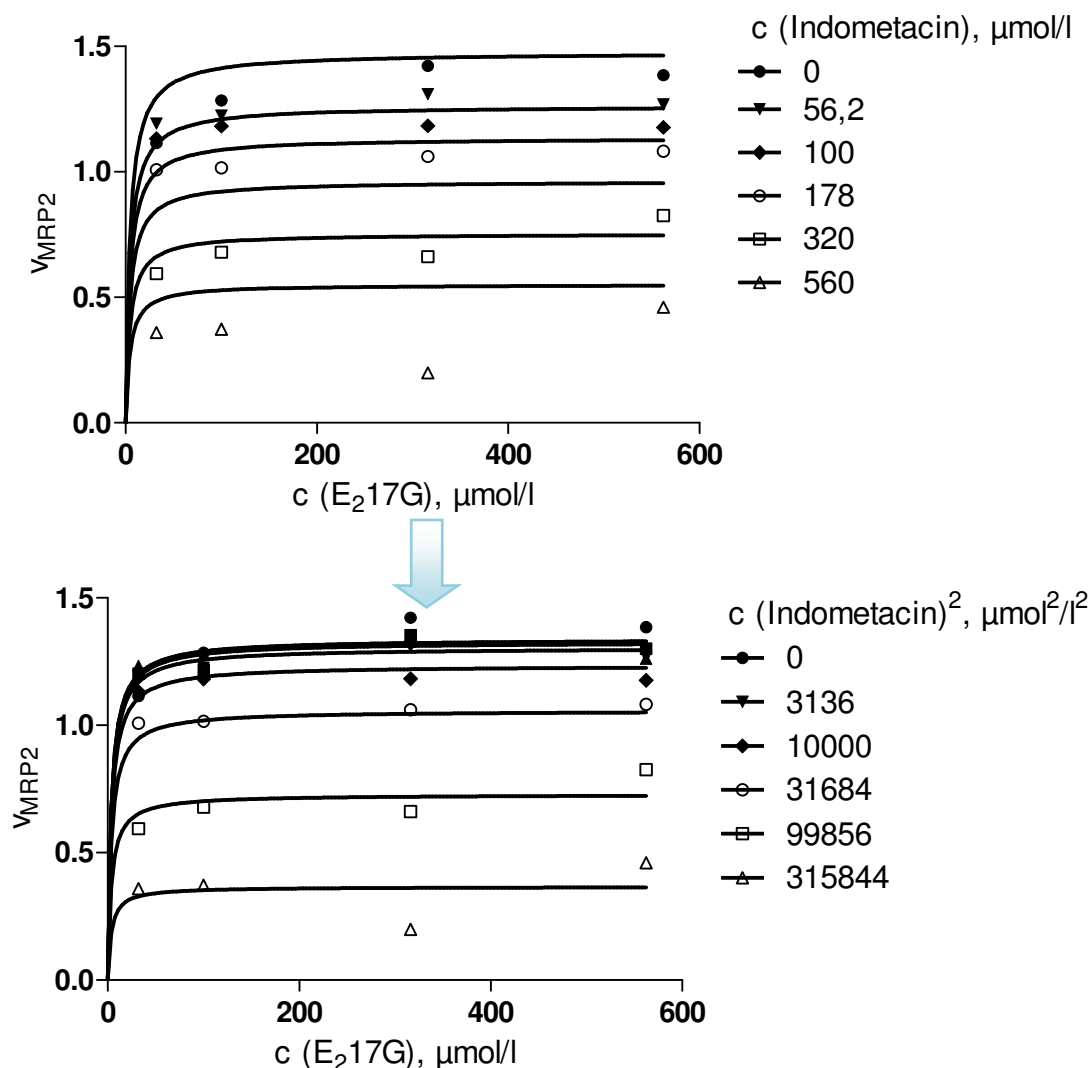


Abbildung 93: Konzentrations-Geschwindigkeits-Diagramm von E₂17G in Abhängigkeit von der Indometacin-Konzentration. Oben: mit normalen Indometacin-Konzentrationen. Unten: Mit quadrierten Konzentrationen. Deutlich zu erkennen ist, dass die Kurvenanpassung unten ($R^2 = 0,971$) deutlich besser ist als oben ($R^2 = 0,880$). Abgebildet ist der Mittelwert eines typischen Experiments aus einer Serie von $n \geq 3$ Wiederholungen.

Es konnten nur zwei Interaktionstypen festgestellt werden: Nichtkompetitiv und kompetitiv. Beispiele für den nichtkompetitiven Interaktionstyp sind in Abbildung 93, Abbildung 95 und Abbildung 97 und Beispiele für den kompetitiven Fall sind in Abbildung 94 und Abbildung 96 exemplarisch dargestellt. Eine Auflistung aller Kombinationen mit dem entsprechenden Interaktionsmuster ist in Tabelle 47 gegeben. Auffällig ist, dass die Verbindungen, die in Kombination mit dem Aktivator eine Rechtsverschiebung der Kurvenverläufe zeigten, in der enzymkinetischen Auswertung ein kompetitives Verhalten demonstrierten und umgekehrt, alle, die keine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven zeigten, demonstrierten ein nichtkompetitives

Interaktionsmuster. Dies impliziert, dass schon aus den Änderungen der Dosis-Wirkungskurven Rückschlüsse auf das Interaktionsmuster gezogen werden können.

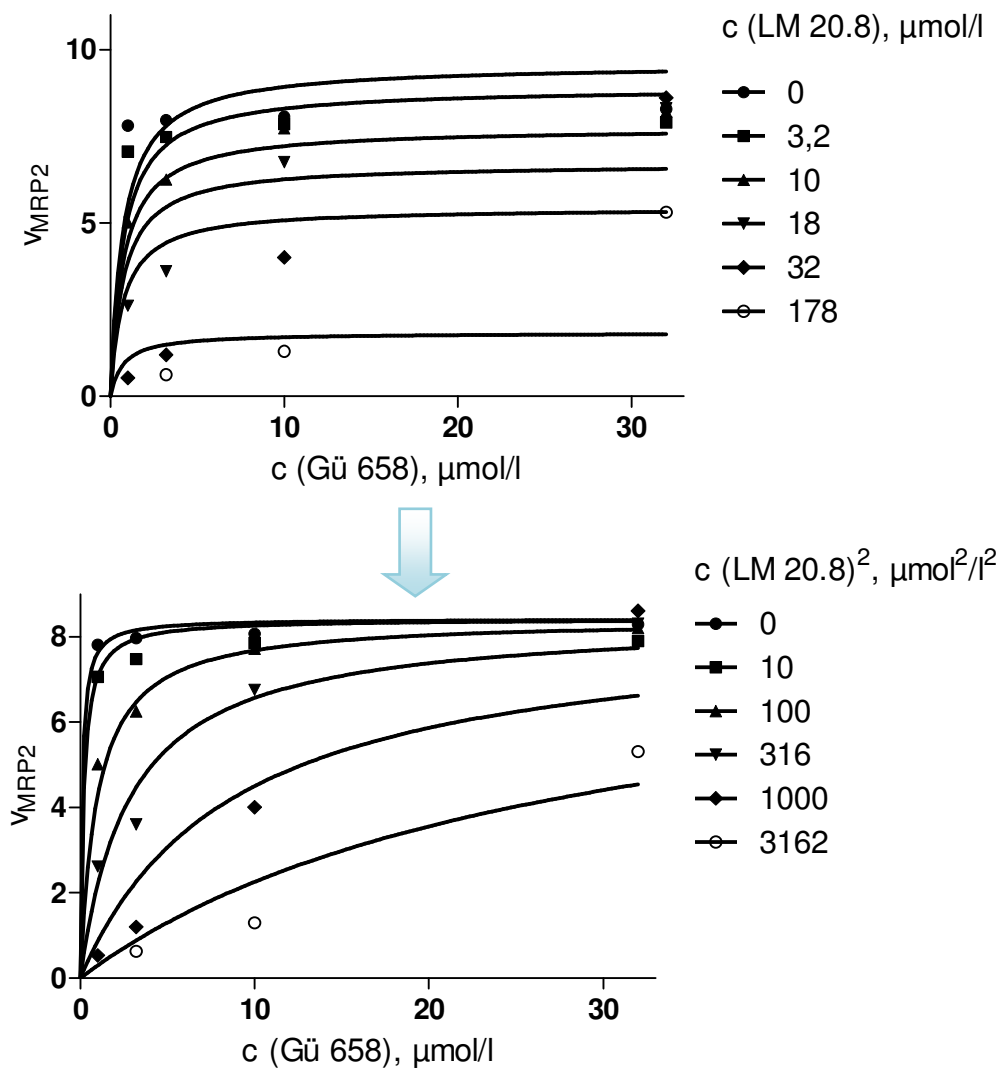


Abbildung 94: Konzentrations-Geschwindigkeits-Diagramm von Gü 658 in Abhängigkeit von der LM 20.8-Konzentration. Oben: Mit „normalen“ LM 20.8-Konzentrationen. Unten: Mit quadrierten Konzentrationen. Deutlich zu erkennen ist, dass die Kurvenanpassung unten ($R^2 = 0,952$) deutlich besser ist als oben ($R^2 = 0,685$). Während oben eine nichtkompetitive Interaktion vorhergesagt wird, zeigt das bessere Modell (unten) eine kompetitive Interaktion der beiden Substanzen. Abgebildet ist der Mittelwert eines typischen Experiments aus einer Serie von $n \geq 3$ Wiederholungen.

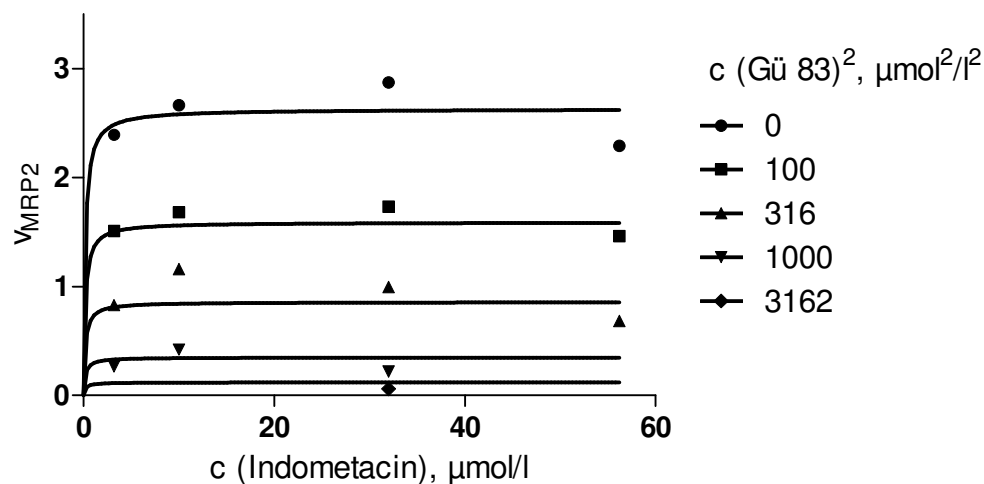


Abbildung 95: Konzentrations-Geschwindigkeits-Diagramm für Indometacin in Abhängigkeit von der Gü 83-Konzentration. Es zeigt sich ein typischer nichtkompetitiver Kurvenverlauf ($R^2 = 0,954$). Abgebildet ist der Mittelwert eines typischen Experiments aus einer Serie von $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten.

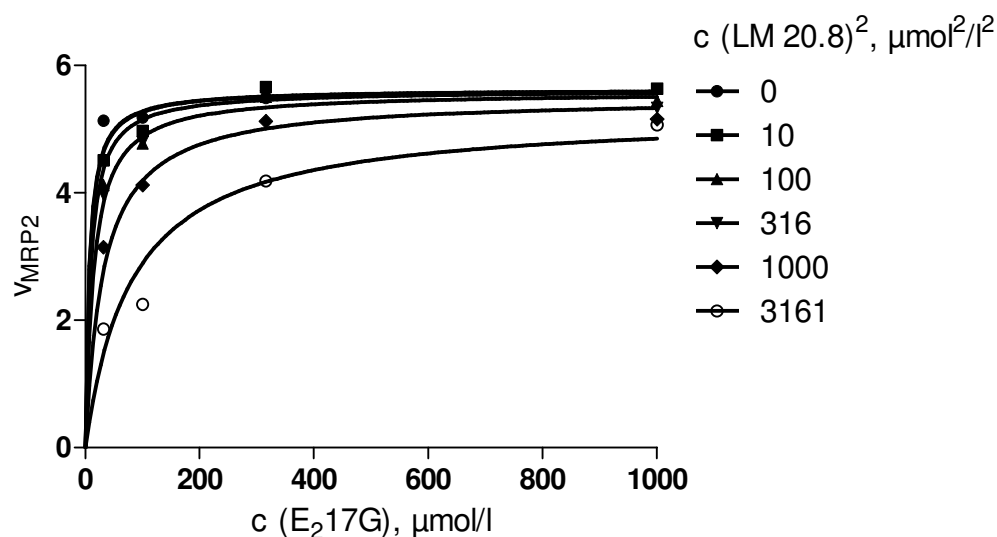


Abbildung 96: Konzentrations-Geschwindigkeits-Diagramm für E₂17G in Abhängigkeit von den LM 20.8-Konzentrationen. Gezeigt wird ein typischer kompetitiver Kurvenverlauf ($R^2 = 0,931$). Abgebildet ist der Mittelwert eines typischen Experiments aus einer Serie von $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten.

Das nichtkompetitive Verhalten von Indometacin mit E₂17G wurde schon von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben [144, 146] und konnte auch über diese Methode reproduziert werden. Werden alle Ergebnisse zusammen betrachtet, zeigt sich, dass bei der Aktivierung immer ein Hill-Koeffizient von 1 berechnet und damit wahrscheinlich nur eine Bindungsstelle besetzt wird, während zur Inhibition des Calcein-AM-Transportes immer ein Hill-Koeffizient um die 2 gemessen wurde und damit wahrscheinlich die Blockierung von zwei Bindungsstellen nötig ist.

Tabelle 47: Auflistung aller durchgeführten Kombinationsassays und den ermittelten Interaktionstypen. Blau hinterlegt im gemessenen Konzentrationsbereich im Assay Aktivator. Gelb hinterlegt sowohl Inhibitor als auch Aktivator. Grau hinterlegt reiner Inhibitor.

Aktivator	Inhibitor (quadriert)	Interaktionstyp
E ₂ 17G	Indometacin	Nichtkompetitiv
E ₂ 17G	LM 20.7	Kompetitiv
E ₂ 17G	LM 20.8	Kompetitiv
Gü 658	LM 20.8	Kompetitiv
Gü 658	Indometacin	Nichtkompetitiv
Gü 658	Gü 83	Nichtkompetitiv
Indometacin	Gü 83	Nichtkompetitiv

D.h. für Indometacin, E₂17G und Gü 658, dass sie erst eine hochaffine Bindungsstelle besetzen, was dann zur Aktivierung führt, und im Überschuss dann die zweite, weniger affine, wodurch es dann zur Blockierung des Calcein-AM-Transportes kommt. Das Vorhandensein von zwei unterschiedlich affinen Bindungsstellen wurde für Indometacin und andere nicht-steroidale Antirheumatika von El Sheikh et al. demonstriert [191] und spiegelt sich in dieser Versuchsanordnung in der Anzahl der Bindungsstellen und der Art der Interaktion mit Calcein-AM wider. Die Aktivierung entspricht dann wahrscheinlich der affinen Bindungsstelle und die Inhibition der weniger affinen.

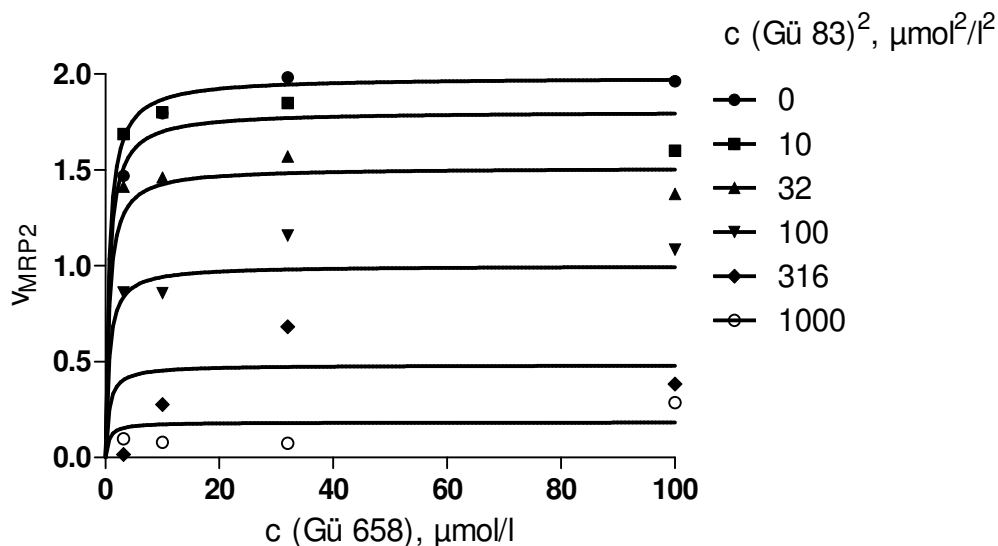


Abbildung 97: Konzentrations-Geschwindigkeits-Diagramm für Gü 658 in Abhängigkeit von der Gü 83-Konzentration. Gezeigt wird ein typischer nichtkompetitiver Kurvenverlauf ($R^2 = 0,954$). Abgebildet ist der Mittelwert eines typischen Experiments aus einer Serie von $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten.

Die LM-Verbindungen zeigen keinen aktivatorischen Effekt, sondern inhibieren anscheinend sofort beide Bindungsstellen. Sie sind recht groß und flexibel, sodass sie möglicherweise zwei Bindungsstellen gleichzeitig erreichen können. Zusätzlich können sie mit Gü 658 und E₂17G um eine Bindungsstelle konkurrieren. Daraus kann geschlossen werden, dass alle drei Verbindungen die gleiche Bindungsstelle besetzen was die in Kapitel 4.8 aufgestellte These über die strukturelle Verwandtschaft von Gü 658 zum E₂17G-Antagonisten LY329146 wahrscheinlich macht. Dies sollte aber nochmals in einem direkten Kompetitions-Assay abgeklärt werden, da auch die Möglichkeit besteht, dass Gü 658 die eine Bindungsstelle der LM-Verbindungen besetzt und E₂17G die andere.

Eine Sonderstellung nimmt Gü 83 ein, da es sich sowohl gegenüber E₂17G als auch gegenüber Indometacin nichtkompetitiv verhält. Dies lässt auf das Vorhandensein einer dritten Bindungsstelle schließen. Für das Vorhandensein einer dritten Bindungsstelle spricht zusätzlich, dass keine Aktivierung für Gü 83 gefunden werden konnte (Vergl. auch Abbildung 57), während dies für Indometacin und E₂17G (und die kleinen Gü-Verbindungen wie Gü 658) der Fall war.

Über die Bindung von Calcein-AM lässt sich aussagen, dass sie sich von mindestens zwei verschiedenen Bindungsstellen (der von Indometacin und von E₂17G) aus aktivieren und durch die Bindung eines zweiten Moleküls derselben Substanz wieder hemmen lässt (z.B. Indometacin oder Gü 658). Dass mehrere Bindungsstellen miteinander interagieren können, zeigten schon Bodo et al. [144]. Sie konnten sogar eine Überkreuzstimulation verschiedener Bindungsstellen belegen. Generell wäre es für Calcein-AM möglich, dass es sich an verschiedene Bindungsstellen anlagert, die sich separat durch E₂17G (oder Gü 658) oder Indometacin aktivieren lassen. Zumindest für MRP1 konnten mehrere Bindungsstellen für das dem Calcein-AM strukturell ähnliche Rhodamin 123 nachgewiesen werden [194].

Es sei auch darauf hingewiesen, dass Kompetition bei ABC-Transportern nicht grundsätzlich bedeutet, dass zwei Moleküle direkt um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren; es kann auch nur zu Überlagerungen in Bindungsregionen kommen. Ähnliches gilt für nichtkompetitives Verhalten, wo in einer Bindungsregion Platz für zwei gleichzeitig gebundene Moleküle ist. Für ABC-Transporter ist dieses Bindungsregionen-Modell nach Higgins et al. das wahrscheinlichere [195], im Vergleich zu dem Schlüssel-Schloss-Prinzip eines Enzyms. Für Gü 83 bedeutet dies, dass es grundsätzlich auch an die gleiche Bindungsregion wie Indometacin oder E₂17G binden kann, aber es durch unterschiedliche Einpassung in die Bindungsregion zu

keinen Überlappungen der Moleküle kommt und somit nichtkompetitives Verhalten gezeigt wird.

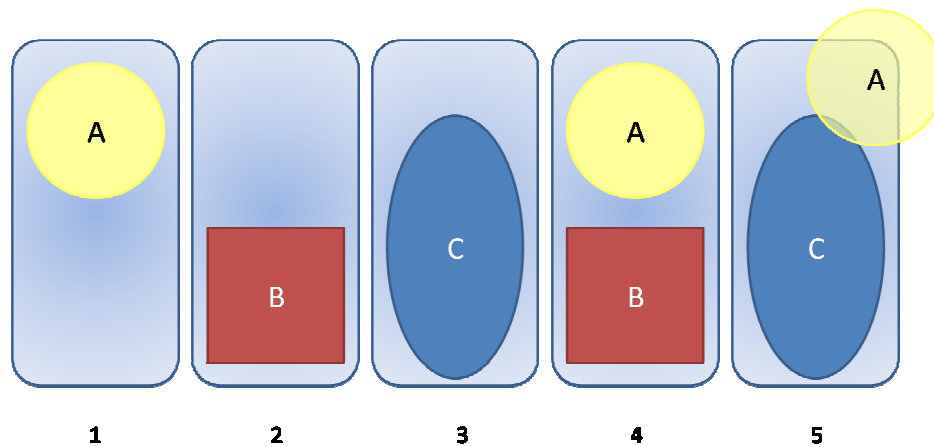


Abbildung 98: Bindungsregionen-Modell modifiziert nach Higgins [195]. Eine einzelne, große Bindungsregion (hellblau) kann Verbindung A (Punkt 1), Verbindung B (Punkt 2) oder Verbindung C (Punkt 3) separat binden. Des Weiteren kann sie A und B gemeinsam binden (Punkt 4), entsprechend wie pharmakologisch unterschiedliche Bindungsstellen, ist aber nicht in der Lage A und C gleichzeitig einzulagern (Punkt 5), wie pharmakologisch gleiche Bindungsstellen.

4.11.4 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Kombinationsassays in MRP2

Über die funktionellen Kombinations-Assays an MRP2 sollten Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten der beiden eingesetzten Verbindungen gezogen werden. Grundsätzlich scheint der indirekte Ansatz der Enzymkinetik mittels eines Geschwindigkeitsmarkers zu funktionieren. Jedoch bleibt abzuwarten, ob sich auch Sonderformen wie Überadditivität mit dieser Auswertung beschreiben lassen. Vorteilhaft ist, dass es möglich ist über einen einfachen, funktionellen Assay Rückschlüsse auf die Interaktion verschiedener Inhibitoren zu ziehen.

Durch die enzymkinetische Auswertung konnte eine mögliche dritte Bindungsregion für Gü 83 ermittelt werden, die sich von den bekannten für E₂17G und Indometacin unterscheidet.

Durch Aufklärung der Anzahl möglicher Bindungsstellen der Inhibitoren war es zudem möglich, eine bessere Anpassung für die Enzymkinetiken zu erhalten sowie Rückschlüsse auf die Aktivierung und Inhibition des Calcein-AM-Transportes von MRP2 zu ziehen. Die Bindung eines Moleküls führt in der Regel zur Aktivierung des Calcein-AM-Transports, während die Bindung eines zweiten Moleküls zur Inhibition führte.

Die LM-Verbindungen und die kleinen Gü-Verbindungen wie z.B. Gü 658 scheinen um die Bindungsstelle von E₂17G zu konkurrieren. Während Gü 658 aber in der Lage ist, eine Aktivierung des Calcein-AM-Transporters herbeizuführen, scheinen die LM-Verbindungen

aufgrund ihrer Größe und des homologen Aufbaus direkt beide Bindungsstellen, sowohl affine als auch weniger affine, zu besetzen und somit ausschließlich eine Inhibition herbeizuführen. In Abbildung 99 sind die Verbindungen, die wahrscheinlich um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, dargestellt. Da vermutet wird, dass auch LY329146 ein E₂17G Analogon darstellt [150], wurde es in die Abbildung mit aufgenommen. Die größte Ähnlichkeit besteht zwischen Gü 658 und LY329146 aufgrund der Benzothiophengrundstruktur. Nach Boumendjel et al. soll die Hydroxygruppe am Aromaten von LY329146 der Hydroxygruppe am Aromaten von E₂17G entsprechen, während die Bi-(Methylsulphonyl)-Gruppe mit der Region des Glukuronids überlappen soll. Wird dies auf Gü 658 übertragen, zeigt sich, dass die Hydroxygruppe am Aromaten nicht essentiell für die Wirkung ist.

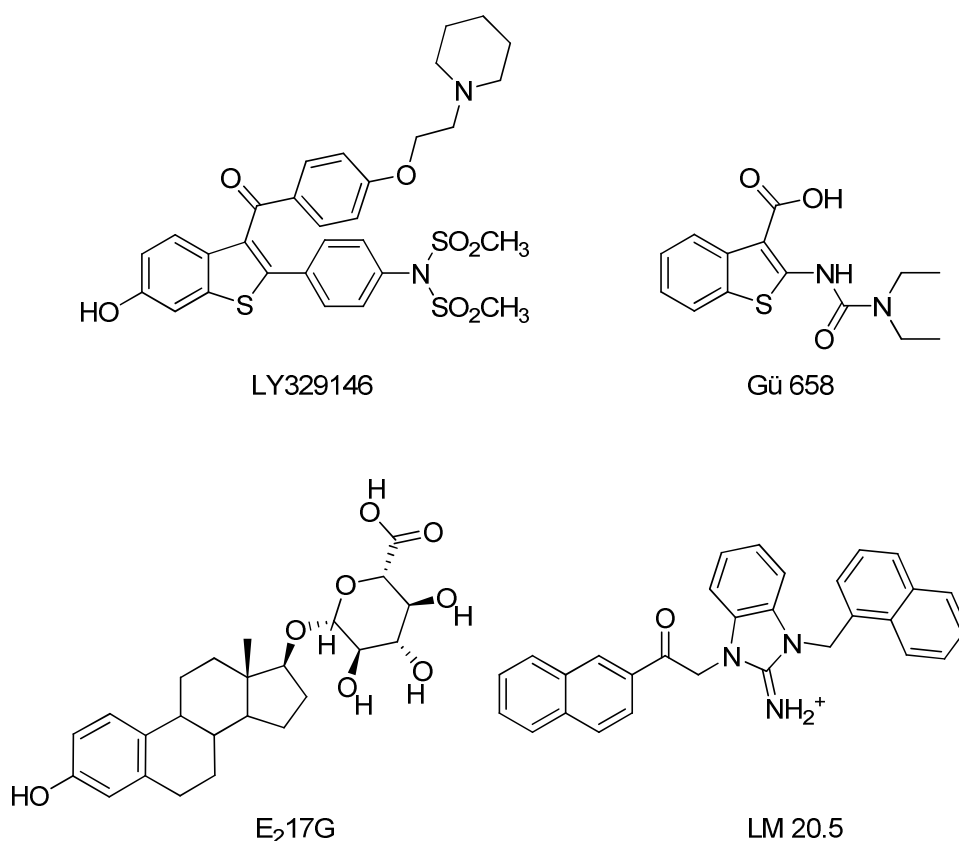


Abbildung 99: Vergleich der Strukturformeln, der um die E₂17G Bindungsstelle konkurrierenden Verbindungen mit E₂17G.

Eine Überlagerung mit der Glukuronid-Bindungsregion wäre dann mit der Harnstofffunktion, insbesondere dem disubstituierten Stickstoff möglich. Dies könnte aber erklären, warum Morpholino- und andere Derivate von Gü 658 mit ringgebundenem Stickstoff in der Regel

schlecht bis unwirksam an MRP1 waren, da sie wahrscheinlich nicht flexibel genug sind, die Bindungsregion auszufüllen. Eine solche Analogie kann für die LM-Verbindungen nicht aufgestellt werden. Was allen in Abbildung 99 dargestellten synthetischen Inhibitoren gemein ist, ist eine Carbonyl-Funktion in α -Position zu einem aromatischen System. Diese ist zwar in E₂17G nicht enthalten, könnte aber einen wichtigen Interaktionspunkt der Inhibitoren bzw. Aktivatoren darstellen. In Kapitel 4.4.4 wurde aufgrund der ähnlichen biologischen Aktivitätsdaten zwischen MRP1, MRP2 und P-gp die These aufgestellt, dass die LM-Verbindungen an eine hochkonservierte Region in den Transportern binden. Durch die enzymkinetische Auswertung konnte gezeigt werden, dass es sich dabei wahrscheinlich um eine Steroid-Bindungsstelle handelt. Für alle Transporter ist eine Interaktion mit Steroiden bekannt [196, 197]. Gü 658 und E₂17G sind keine Inhibitoren für P-gp, was wahrscheinlich auf ihre Säurefunktion zurückzuführen ist; im Gegenzug scheint das Fehlen der Funktion die Begründung für die Aktivität der LM-Verbindungen an P-gp zu sein. Anscheinend ist sowohl die Position als auch das Vorhandensein der Säurefunktion für die allosterische Bindung wichtig, so demonstrierten Gerk et al. [143], dass β -Estradiol-3-Glukuronid von MRP2 zwar erkannt wird, aber nicht in der Lage ist die allosterische Wechselwirkung auszulösen. Ähnlich wird es mit den LM-Verbindungen sein, die zwar mit der Steroidbindungsstelle interagieren können, aber dennoch nicht in der Lage sind, eine Aktivierung an MRP2 auszulösen. Zusätzlich scheinen die LM-Verbindungen direkt mit zwei Bindungsstellen zu interagieren worauf der Hill-Koeffizient und eine benötigte Quadrierung der Konzentrationen bei der enzymkinetischen Auswertung hinweisen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der durch MRP2 vermittelte Calcein-AM-Transport sehr komplex ist und noch nicht alle Facetten aufgeklärt werden konnten. Dennoch konnten einige noch offene Fragen aus den vorherigen Kapiteln mit Hilfe des enzymkinetischen Auswertungsansatzes geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Die Multidrug-Resistenz (MDR) stellt ein ernstzunehmendes Problem in der Therapie maligner Tumore dar. Eine Ursache dieses MDR-Phänotyps ist die Überexpression von Multidrug resistance associated proteins (MRPs), insbesondere MRP1 und MRP2. MRP1 und MRP2 sind in der Lage eine Vielzahl an konjugierten und unkonjugierten Verbindungen, darunter viele Zytostatika, unter ATP-Verbrauch aus der Zelle zu entfernen und so eine Resistenz auszulösen. Ziel dieser Arbeit war es neue Modulatoren zur Aufhebung der MRP1 und MRP2 induzierten MDR zu finden und zu charakterisieren. Dazu wurden verschiedene auf überexprimierenden Zellen basierende Akkumulations-Assays entwickelt, etabliert oder bereits bestehende modifiziert und angewendet, um die Eigenschaften neuer Modulatoren zu charakterisieren. Als besonders effektiv erwies sich der neu etablierte und modifizierte Calcein-AM-Assay für MRP1 und MRP2 durch den einige neue Modulatoren identifiziert werden konnten. Um die Selektivität der neu entdeckten Modulatoren zu untersuchen, wurde zusätzlich der bereits etablierte Calcein-AM-Assay für P-gp angewendet.

Als neue Klasse von Inhibitoren wurden unter anderem Benzimidazolderivate entdeckt. Sie hemmen den Transport durch MRP1, MRP2 und P-gp, wobei eine hohe Korrelation der Effektivitätsdaten zwischen den Transportern nachgewiesen werden konnte. Dies weist auf einen hohen Verwandtschaftsgrad aller drei Transporter hin. Die inhibitorisch aktivsten Substanzen sind im unteren mikromolaren Bereich an allen Resistenzproteinen wirksam. Durch Einsatz der 3D-QSAR-Methoden CoMFA und CoMSIA konnten zusätzlich aussagekräftige Modelle zur Beschreibung der Strukturwirkungsbeziehungen für MRP1, MRP2 und P-gp generiert werden. Die Strukturwirkungsbeziehungen ließen sich am besten durch sterische bzw. hydrophobe Wechselwirkungen beschreiben und zeigten einen hohen Verwandtschaftsgrad der drei Resistenzproteine.

Als weitere Klasse von neuen Modulatoren erwiesen sich die ortho-Thioureidocarbonsäuren und deren Harnstoffderivate sowie die entsprechenden Benzoessäurederivate. Sie zeigten keine Aktivität an P-gp und sind damit selektive Modulatoren von MRP1. Die besten Substanzen sind mit einem IC_{50} -Wert unter 1 $\mu\text{mol/l}$ an MRP1 hochpotent. Für diese Modulatorklasse konnte ein einfaches Pharmakophormodell erstellt werden. Im Calcein-AM-Assay für MRP2 wirkte diese Substanzklasse hingegen aktivierend und erst in hohen Konzentrationen inhibierend.

Als dritte neue Klasse an Modulatoren für MRP1 und MRP2 erwiesen sich p-Aminobenzoesäure-Derivate. Sie inhibierten sowohl den MRP1 als auch MRP2 vermittelten Calcein-AM-Transport. Die aktivste Substanz war mit einem IC_{50} -Wert von etwa 1 $\mu\text{mol/l}$ an MRP1 und um die 20 $\mu\text{mol/l}$ an MRP2 potenter als alle gängigen Standardsubstanzen.

Die neu entwickelten und charakterisierten Verbindungen wurden mit bekannten Modulatoren aus der Literatur verglichen. Es zeigte sich, dass sie häufig äquipotent oder, insbesondere an MRP2, sogar besser wirksam waren als die in der Literatur beschriebenen.

Da MRP1 und MRP2 dafür bekannt sind auch Glutathion und Glutathionkonjugate zu transportieren, wurden neue fluoreszenzbasierte Assays zur Quantifizierung des intrazellulären und des hinaus transportierten Glutathions entwickelt und etabliert. Die Bestimmung des intrazellulären Glutathions ergab mit entsprechenden Daten aus Veröffentlichungen vergleichbare Ergebnisse. Im Assay zur Bestimmung des hinaus transportierten Glutathions wurde exemplarisch aus jeder der neu entdeckten Modulatorklassen eine Verbindung ausgewählt und untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass keine der Substanzen mit Glutathion assoziiert transportiert wird.

Neben den neuen Modulatoren wurde auch die für MRP2 diskutierte Cisplatinresistenz mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie genauer untersucht. Es konnte demonstriert werden, dass der Resistenzfaktor von den MRP2 exprimierenden Zellen gegenüber Cisplatin mit der Differenz in der Platinakkumulation nahezu identisch ist. Die Resistenz war unter Einsatz eines MRP2-Inhibitors reversibel, wohingegen ein künstlich ausgelöster Glutathion-Mangelphänotyp keinen Einfluss auf die Cisplatinaufnahme zeigte. Ebenso konnte demonstriert werden, dass Cisplatin nicht mit Glutathion assoziiert aus den Zellen hinaus transportiert wird, sodass die in der Literatur diskutierte Rolle von Glutathion bei der Detoxifikation von Cisplatin über MRP2 widerlegt werden konnte.

In einem letzten Schritt wurden Kombinations-Experimente für MRP2 jeweils mit einem Aktivator und einem Inhibitor durchgeführt. Es wurde eine Dose-Ratio-Auswertung, Untersuchungen zur Anzahl von interagierenden Bindungsstellen und eine enzymkinetische Auswertung vorgenommen. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass zur Inhibition des MRP2 vermittelten Calcein-AM-Transportes zwei Bindungsstellen blockiert werden müssen, während zur Aktivierung des Transportes die Bindung an einer Bindungsstelle ausreicht. Bei der enzymkinetischen Auswertung konnten über die durch den Inhibitor und den Aktivator ausgelöste Änderung der Transportgeschwindigkeit, Rückschlüsse auf deren Interaktion gezogen

werden. So konnten die zwei bekannten Bindungsstellen für β -Estradiol-17- β -D-Glukuronid und Indometacin an MRP2 unterschieden werden. Des Weiteren zeigte sich, dass sowohl die ortho-Thioureidocarbonsäuren als auch die Benzimidazolderivate mit β -Estradiol-17- β -D-Glukuronid um die Steroidbindungsstelle konkurrieren. Das p-Aminobenzoessäure-Derivat Gü 83 scheint weder an die Steroidbindungsstelle noch an die Bindungsstelle des Indometacins zu binden, was auf eine mögliche dritte Bindungsstelle schließen lässt.

Die in dieser Arbeit entwickelten und eingesetzten Methoden können zur Charakterisierung der MRP1 und MRP2 induzierten Multidrug-Resistenz herangezogen werden und somit Einblicke in die Funktion dieser Resistenzproteine geben.

6 Referenzen

- [1] Lockhart AC, Tirona RG, Kim RB. Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in cancer and chemotherapy. *Mol Cancer Thera* 2003;2:685-98.
- [2] Dean M, Annilo T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005;6:123-42.
- [3] Allikmets R, Gerrard B, Hutchinson A, Dean M. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet* 1996;5:1649-55.
- [4] Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001;11:1156-66.
- [5] Linton KJ. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* 2007;22:122-30.
- [6] Kim WS, Weickert CS, Garner B. Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. *J Neurochem* 2008;104:1145-66.
- [7] Choudhuri S, Klaassen CD. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol* 2006;25:231-59.
- [8] Vulevic B, Chen Z, Boyd JT, Davis W, Jr., Walsh ES, Belinsky MG, et al. Cloning and characterization of human adenosine 5'-triphosphate-binding cassette, sub-family A, transporter 2 (ABCA2). *Cancer Res* 2001;61:3339-47.
- [9] Schmitz G, Kaminski WE. ABC transporters and cholesterol metabolism. *Front Biosci* 2001;6:D505-D514.
- [10] Velamakanni S, Wei SL, Janvilisri T, van Veen HW. ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles : a brief overview. *J Bioenerg Biomembr* 2007;39:465-71.
- [11] Krishnamurthy P, Schuetz JD. Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:381-410.
- [12] Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204:216-37.
- [13] Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 1998;58:5337-9.

-
- [14] van Herwaarden AE, Schinkel AH. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:10-6.
- [15] Ozvegy C, Litman T, Szakacs G, Nagy Z, Bates S, Varadi A, et al. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:111-7.
- [16] Bates S. Solving the Problem of Multidrug Resistance: ABC Transporters in Clinical Oncology. In: Holland IB, Cole SP, Kuchler K, Higgins CF, editors. *ABC Proteins: From Bacteria to Man*. 2003. p. 359-91.
- [17] Jones PM, George AM. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:682-99.
- [18] Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976;455:152-62.
- [19] Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986;47:381-9.
- [20] Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Processing mutations located throughout the human multidrug resistance P-glycoprotein disrupt interactions between the nucleotide binding domains. *J Biol Chem* 2004;279:38395-401.
- [21] Wiese M, Pajeva IK. Structure-activity relationships of multidrug resistance reversers. *Curr Med Chem* 2001;8:685-713.
- [22] Schinkel AH, Kemp S, Dolle M, Rudenko G, Wagenaar E. N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein. *J Biol Chem* 1993;268:7474-81.
- [23] Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:361-98.
- [24] Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Gentle C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:219-34.
- [25] Eytan GD, Regev R, Oren G, Assaraf YG. The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation. *J Biol Chem* 1996;271:12897-902.
- [26] Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 1981;41:1967-72.
- [27] Shukla S, Wu CP, Ambudkar SV. Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4:205-23.

- [28] te Boekhorst PA, van KJ, Schoester M, Sonneveld P. Reversal of typical multidrug resistance by cyclosporin and its non-immunosuppressive analogue SDZ PSC 833 in Chinese hamster ovary cells expressing the *mdr1* phenotype. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992;30:238-42.
- [29] Sonneveld P, Marie JP, Huisman C, Vekhoff A, Schoester M, Faussat AM, et al. Reversal of multidrug resistance by SDZ PSC 833, combined with VAD (vincristine, doxorubicin, dexamethasone) in refractory multiple myeloma. A phase I study. *Leukemia* 1996;10:1741-50.
- [30] List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2001;98:3212-20.
- [31] Wattel E, Solary E, Hecquet B, Caillot D, Ifrah N, Brion A, et al. Quinine improves results of intensive chemotherapy (IC) in myelodysplastic syndromes (MDS) expressing P-glycoprotein (PGP). Updated results of a randomized study. Groupe Francais des Myelodysplasies (GFM) and Groupe GOELAMS. *Adv Exp Med Biol* 1999;457:35-46.
- [32] Jekerle V, Wang JH, Scollard DA, Reilly RM, Wiese M, Piquette-Miller M. ^{99m}Tc-Sestamibi, a sensitive probe for in vivo imaging of P-glycoprotein inhibition by modulators and *mdr1* antisense oligodeoxynucleotides. *Mol Imaging Biol* 2006;8:333-9.
- [33] Deeley RG, Westlake C, Cole SP. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* 2006;86:849-99.
- [34] Hipfner DR, Deeley RG, Cole SP. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* 1999;1461:359-76.
- [35] DiSaia PJ, Sinkovics JG, Rutledge FN, Smith JP. Cell-mediated immunity to human malignant cells. A brief review and further studies with two gynecologic tumors. *Am J Obstet Gynecol* 1972;114:979-89.
- [36] Chang XB. A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:15-37.
- [37] Deeley RG, Cole SP. Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin Cancer Biol* 1997;8:193-204.
- [38] Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ, et al. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* 2002;10:139-49.
- [39] Hou Y, Cui L, Riordan JR, Chang X. Allosteric interactions between the two non-equivalent nucleotide binding domains of multidrug resistance protein MRP1. *J Biol Chem* 2000;275:20280-7.

-
- [40] Gao M, Cui HR, Loe DW, Grant CE, Almquist KC, Cole SP, et al. Comparison of the functional characteristics of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. *J Biol Chem* 2000;275:13098-108.
- [41] Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:918-26.
- [42] Payen L, Gao M, Westlake C, Theis A, Cole SP, Deeley RG. Functional interactions between nucleotide binding domains and leukotriene C4 binding sites of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *Mol Pharmacol* 2005;67:1944-53.
- [43] Payen LF, Gao M, Westlake CJ, Cole SP, Deeley RG. Role of carboxylate residues adjacent to the conserved core Walker B motifs in the catalytic cycle of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *J Biol Chem* 2003;278:38537-47.
- [44] Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992;258:1650-4.
- [45] Grant CE, Kurz EU, Cole SP, Deeley RG. Analysis of the intron-exon organization of the human multidrug-resistance protein gene (MRP) and alternative splicing of its mRNA. *Genomics* 1997;45:368-78.
- [46] Cole SP, Deeley RG. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* 1998;20:931-40.
- [47] Bakos E, Hegedus T, Hollo Z, Welker E, Tusnady GE, Zaman GJ, et al. Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* 1996;271:12322-6.
- [48] Hipfner DR, Almquist KC, Leslie EM, Gerlach JH, Grant CE, Deeley RG, et al. Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH₂ terminus. *J Biol Chem* 1997;272:23623-30.
- [49] Bakos E, Evers R, Szakacs G, Tusnady GE, Welker E, Szabo K, et al. Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem* 1998;273:32167-75.
- [50] Almquist KC, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SP, Deeley RG. Characterization of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cell. *Cancer Res* 1995;55:102-10.
- [51] Buchler M, Konig J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, et al. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* 1996;271:15091-8.

- [52] Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y. Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am J Physiol* 1997;272:G16-G22.
- [53] Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* 2007;453:643-59.
- [54] Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, et al. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* 1996;56:4124-9.
- [55] Toh S, Wada M, Uchiumi T, Inokuchi A, Makino Y, Horie Y, et al. Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *Am J Hum Genet* 1999;64:739-46.
- [56] Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and cells. *Mol Pharmacol* 1999;55:929-37.
- [57] Gerk PM, Vore M. Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:407-15.
- [58] Wright SR, Boag AH, Valdimarsson G, Hipfner DR, Campling BG, Cole SP, et al. Immunohistochemical detection of multidrug resistance protein in human lung cancer and normal lung. *Clin Cancer Res* 1998;4:2279-89.
- [59] Flens MJ, Zaman GJ, van d, V, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, et al. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol* 1996;148:1237-47.
- [60] Brechot JM, Hurbain I, Fajac A, Daty N, Bernaudin JF. Different pattern of MRP localization in ciliated and basal cells from human bronchial epithelium. *J Histochem Cytochem* 1998;46:513-7.
- [61] Deeley RG, Cole SP. Multidrug Resistance Protein 1. In: Holland IB, Cole SP, Kuchler K, Higgins CF, editors. *ABC Proteins: From Bacteria to Man*. 2003. p. 393-422.
- [62] Wijnholds J, deLange EC, Scheffer GL, van den Berg DJ, Mol CA, van d, V, et al. Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Clin Invest* 2000;105:279-85.
- [63] Morrow CS, Smitherman PK, Townsend AJ. Role of multidrug-resistance protein 2 in glutathione S-transferase P1-1-mediated resistance to 4-nitroquinoline 1-oxide toxicities in HepG2 cells. *Mol Carcinog* 2000;29:170-8.
- [64] Paumi CM, Ledford BG, Smitherman PK, Townsend AJ, Morrow CS. Role of multidrug resistance protein 1 (MRP1) and glutathione S-transferase A1-1 in alkylating agent resistance. Kinetics of glutathione conjugate formation and efflux

- govern differential cellular sensitivity to chlorambucil versus melphalan toxicity. *J Biol Chem* 2001;276:7952-6.
- [65] Zaman GJ, Lankelma J, van Tellingen O, Beijnen J, Dekker H, Paulusma C, et al. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7690-4.
- [66] Renes J, de Vries EE, Hooiveld GJ, Krikken I, Jansen PL, Muller M. Multidrug resistance protein MRP1 protects against the toxicity of the major lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Biochem J* 2000;350 Pt 2:555-61.
- [67] Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:124-31.
- [68] St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoechli M, Lauper U, et al. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279:R1495-R1503.
- [69] Kamisako T, Leier I, Cui Y, Konig J, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, et al. Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2. *Hepatology* 1999;30:485-90.
- [70] Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 1999;55:929-37.
- [71] Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2006;2:351-66.
- [72] DUBIN IN, JOHNSON FB. Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. *Medicine (Baltimore)* 1954;33:155-97.
- [73] Dietrich CG, de Waart DR, Ottenhoff R, Bootsma AH, van Gennip AH, Elferink RP. Mrp2-deficiency in the rat impairs biliary and intestinal excretion and influences metabolism and disposition of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo. *Carcinogenesis* 2001;22:805-11.
- [74] Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, et al. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1997;57:3537-47.
- [75] Konig J, Nies AT, Cui Y, Keppler D. MRP2, the apical export pump for anionic conjugates. In: Holland IB, Cole SP, Kuchler K, Higgins CF, editors. *ABC Proteins: From Bacteria to Man*. 2003. p. 423-43.

- [76] Terlouw SA, Graeff C, Smeets PH, Fricker G, Russel FG, Masereeuw R, et al. Short- and long-term influences of heavy metals on anionic drug efflux from renal proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:578-85.
- [77] Plasschaert SL, de Bont ES, Boezen M, vander Kolk DM, Daenen SM, Faber KN, et al. Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2005;11:8661-8.
- [78] van der Kolk DM, de Vries EG, van Putten WJ, Verdonck LF, Ossenkoppele GJ, Verhoef GE, et al. P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2000;6:3205-14.
- [79] Gandhi L, Harding MW, Neubauer M, Langer CJ, Moore M, Ross HJ, et al. A phase II study of the safety and efficacy of the multidrug resistance inhibitor VX-710 combined with doxorubicin and vincristine in patients with recurrent small cell lung cancer. *Cancer* 2007;109:924-32.
- [80] Saeki T, Nomizu T, Toi M, Ito Y, Noguchi S, Kobayashi T, et al. Dofequidar fumarate (MS-209) in combination with cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil for patients with advanced or recurrent breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:411-7.
- [81] Soini Y, Jarvinen K, Kaarteenaho-Wiik R, Kinnula V. The expression of P-glycoprotein and multidrug resistance proteins 1 and 2 (MRP1 and MRP2) in human malignant mesothelioma. *Ann Oncol* 2001;12:1239-45.
- [82] Young LC, Campling BG, Cole SP, Deeley RG, Gerlach JH. Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. *Clin Cancer Res* 2001;7:1798-804.
- [83] Schaub TP, Kartenbeck J, Konig J, Spring H, Dorsam J, Staehler G, et al. Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1159-69.
- [84] www.gaa-m-s.bayern.de/downloads/zytostatika.pdf. Umgang mit Zytostatika. 2002.
- [85] Hamilton TC, Young RC, Ozols RF. Experimental model systems of ovarian cancer: applications to the design and evaluation of new treatment approaches. *Semin Oncol* 1984;11:285-98.
- [86] Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, et al. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res* 1999;59:2532-5.
- [87] Kool M, van der LM, de HM, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, et al. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6914-9.
- [88] Louvard D. Apical membrane aminopeptidase appears at site of cell-cell contact in cultured kidney epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:4132-6.

-
- [89] Evers R, Kool M, van DL, Janssen H, Calafat J, Oomen LC, et al. Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J Clin Invest* 1998;101:1310-9.
- [90] Bakos E, Evers R, Szakacs G, Tusnady GE, Welker E, Szabo K, et al. Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem* 1998;273:32167-75.
- [91] Kaplan RS, Pedersen PL. Determination of microgram quantities of protein in the presence of milligram levels of lipid with amido black 10B. *Anal Biochem* 1985;150:97-104.
- [92] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- [93] Naito M, Tsuruo T. Monoclonal antibodies to P-glycoprotein: preparation and applications to basic and clinical research. *Methods Enzymol* 1998;292:258-65.
- [94] Laupeze B, Amiot L, Courtois A, Vernhet L, Drenou B, Fauchet R, et al. Use of the anionic dye carboxy-2',7'-dichlorofluorescein for sensitive flow cytometric detection of multidrug resistance-associated protein activity. *Int J Oncol* 1999;15:571-6.
- [95] Mueller H. Funktionelle Untersuchungen des ABC-Transporters P-Glykoprotein [Dissertation] Universität Bonn; 2007.
- [96] Raffael A, Nebe T, Valet G. Grundlagen der Durchflusszytometrie. *Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Stuttgart: Schattauer; 1994. p. 1-48.
- [97] Zaman GJ, Flens MJ, van Leusden MR, de Haas M, Mulder HS, Lankelma J, et al. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:8822-6.
- [98] Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen JH, Schellens JH. Concise review: Clinical relevance of drug drug and herb drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Oncologist* 2007;12:927-41.
- [99] Plumbridge TW, Brown JR. Spectrophotometric and fluorescence polarization studies of the binding of ethidium, daunomycin and mepacrine to DNA and to poly(I-C). *Biochim Biophys Acta* 1977;479:441-9.
- [100] Olson DP, Taylor BJ, Ivy SP. Detection of MRP functional activity: calcein AM but not BCECF AM as a Multidrug Resistance-related Protein (MRP1) substrate. *Cytometry* 2001;46:105-13.
- [101] Feller N, Broxterman HJ, Wahrer DC, Pinedo HM. ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion. *FEBS Lett* 1995;368:385-8.

- [102] Essodaigui M, Broxterman HJ, Garnier-Suillerot A. Kinetic analysis of calcein and calcein-acetoxymethylester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein. *Biochemistry* 1998;37:2243-50.
- [103] Martin AM, Swabrick J, Cammarata A, Stricker H. *Physikalische Pharmazie*. 3. Auflage ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft; 1987.
- [104] Mueller H, Kassack MU, Wiese M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J Biomol Screen* 2004;9:506-15.
- [105] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- [106] Liedert B, Materna V, Schadendorf D, Thomale J, Lage H. Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin. *J Invest Dermatol* 2003;121:172-6.
- [107] Materna V, Liedert B, Thomale J, Lage H. Protection of platinum-DNA adduct formation and reversal of cisplatin resistance by anti-MRP2 hammerhead ribozymes in human cancer cells. *Int J Cancer* 2005;115:393-402.
- [108] Orwar O, Fishman HA, Ziv NE, Scheller RH, Zare RN. Use of 2,3-naphthalenedicarboxaldehyde derivatization for single-cell analysis of glutathione by capillary electrophoresis and histochemical localization by fluorescence microscopy. *Anal Chem* 1995;67:4261-8.
- [109] Gottwald W. *Statistik für Anwender*. Weinheim: Wiley-VCH; 2000.
- [110] Motulsky HJ. *Prism 5 Statistics Guide*. San Diego CA: GraphPad Software Inc.; 2007.
- [111] Ma L, Pratt SE, Cao J, Dantzig AH, Moore RE, Slapak CA. Identification and characterization of the multidrug resistance-associated protein. *Mol Cancer Ther* 2002;1:1335-42.
- [112] Conrad S, Viertelhaus A, Orzechowski A, Hoogstraate J, Gjellan K, Schrenk D, et al. Sequencing and tissue distribution of the canine MRP2 gene compared with MRP1 and MDR1. *Toxicology* 2001;156:81-91.
- [113] Ohishi Y, Oda Y, Uchiumi T, Kobayashi H, Hirakawa T, Miyamoto S, et al. ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human primary ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:3767-75.
- [114] Jekerle V, Klinkhammer W, Scollard DA, Breitbach K, Reilly RM, Piquette-Miller M, et al. In vitro and in vivo evaluation of WK-X-34, a novel inhibitor of P-glycoprotein and BCRP, using radio imaging techniques. *Int J Cancer* 2006;119:414-22.

-
- [115] Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, et al. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res* 1999;59:2532-5.
- [116] Sarin J, Aggarwal S, Chaba R, Varshney GC, Chakraborti PK. B-subunit of phosphate-specific transporter from *Mycobacterium tuberculosis* is a thermostable ATPase. *J Biol Chem* 2001;276:44590-7.
- [117] Bakos E, Evers R, Sinko E, Varadi A, Borst P, Sarkadi B. Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Mol Pharmacol* 2000;57:760-8.
- [118] Evers R, de Haas M, Sparidans R, Beijnen J, Wielinga PR, Lankelma J, et al. Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br J Cancer* 2000;83:375-83.
- [119] Gollapudi S, Kim CH, Tran BN, Sangha S, Gupta S. Probenecid reverses multidrug resistance in multidrug resistance-associated protein-overexpressing HL60/AR and H69/AR cells but not in P-glycoprotein-overexpressing HL60/Tax and P388/ADR cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997;40:150-8.
- [120] Evers R, Kool M, Smith AJ, van DL, de HM, Borst P. Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp-. *Br J Cancer* 2000;83:366-74.
- [121] Reid G, Wielinga P, Zelcer N, van dH, I, Kuil A, de HM, et al. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9244-9.
- [122] Wang S, Ryder H, Pretswell I, Depledge P, Milton J, Hancox TC, et al. Studies on quinazolinones as dual inhibitors of Pgp and MRP1 in multidrug resistance. *Bioorg Med Chem Lett* 2002;12:571-4.
- [123] Jekerle V, Klinkhammer W, Reilly RM, Piquette-Miller M, Wiese M. Novel tetrahydroisoquinolin-ethyl-phenylamine based multidrug resistance inhibitors with broad-spectrum modulating properties. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;59:61-9.
- [124] Muller H, Klinkhammer W, Globisch C, Kassack MU, Pajeva IK, Wiese M. New functional assay of P-glycoprotein activity using Hoechst 33342. *Bioorg Med Chem* 2007;15:7470-9.
- [125] Sarkadi B, Homolya L, Hollo Z, inventors; Assay and reagent kit for evaluation of multi-drug resistance in cells.6391656. 2002 May 24.
- [126] Leier I, Hummel-Eisenbeiss J, Cui Y, Keppler D. ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2. *Kidney Int* 2000;57:1636-42.
- [127] Loe DW, Deeley RG, Cole SP. Verapamil stimulates glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:530-8.

- [128] Yang JJ, Ann DK, Kannan R, Lee VH. Multidrug resistance protein 1 (MRP1) in rabbit conjunctival epithelial cells: its effect on drug efflux and its regulation by adenoviral infection. *Pharm Res* 2007;24:1490-500.
- [129] Forster F, Volz A, Fricker G. Compound profiling for ABCC2 (MRP2) using a fluorescent microplate assay system. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;69:396-403.
- [130] Kondratov RV, Komarov PG, Becker Y, Ewenson A, Gudkov AV. Small molecules that dramatically alter multidrug resistance phenotype by modulating the substrate specificity of P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:14078-83.
- [131] Lai Y, Xing L, Poda GI, Hu Y. Structure-activity relationships for interaction with multidrug resistance protein 2 (ABCC2/MRP2): the role of torsion angle for a series of biphenyl-substituted heterocycles. *Drug Metab Dispos* 2007;35:937-45.
- [132] Eugene KG, Abraham DJ. Hydrophobicity: is LogP(o/w) more than the sum of its parts? *Eur J Med Chem* 2000;35:651-61.
- [133] Dearden JC. Partitioning and lipophilicity in quantitative structure-activity relationships. *Environ Health Perspect* 1985;61:203-28.
- [134] Ferte J. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur J Biochem* 2000;267:277-94.
- [135] Bisswanger H. *Enzyme kinetics, Principles and Methods*. 1st ed. Mannheim: Wiley-VCH; 2002.
- [136] Cramer RD, III, Patterson DE, Bunce JD. Recent advances in comparative molecular field analysis (CoMFA). *Prog Clin Biol Res* 1989;291:161-5.
- [137] Klebe G, Abraham U, Mietzner T. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *J Med Chem* 1994;37:4130-46.
- [138] Halgren TA. Merck molecular force field .1. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J Comput Chem* 1996;17:490-519.
- [139] Clark M, Cramer RD. The Probability of Chance Correlation Using Partial Least-Squares (PLS). *QSAR* 1993;12:137-45.
- [140] Tripos. *Tripos Bookshelf v7.2*. Tripos Inc.; 2009.
- [141] Conseil G, Deeley RG, Cole SP. Polymorphisms of MRP1 (ABCC1) and related ATP-dependent drug transporters. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:523-33.
- [142] Wiendlocha J. *Identification and Characterization of Novel MRP1 Inhibitors* [Diplomathesis] Universität Bonn; 2008.

- [143] Gerke PM, Li W, Vore M. Estradiol 3-glucuronide is transported by the multidrug resistance-associated protein 2 but does not activate the allosteric site bound by estradiol 17-glucuronide. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1139-45.
- [144] Bodo A, Bakos E, Szeri F, Varadi A, Sarkadi B. Differential modulation of the human liver conjugate transporters MRP2 and MRP3 by bile acids and organic anions. *J Biol Chem* 2003;278:23529-37.
- [145] Gerke PM, Li W, Megaraj V, Vore M. Human multidrug resistance protein 2 transports the therapeutic bile salt tauroursodeoxycholate. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320:893-9.
- [146] Zelcer N, Huisman MT, Reid G, Wielinga P, Breedveld P, Kuil A, et al. Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2). *J Biol Chem* 2003;278:23538-44.
- [147] Pedersen JM, Matsson P, Bergstrom CA, Norinder U, Hoogstraate J, Artursson P. Prediction and identification of drug interactions with the human ATP-binding cassette transporter multidrug-resistance associated protein 2 (MRP2; ABCC2). *J Med Chem* 2008;51:3275-87.
- [148] Chen C, Mireles RJ, Campbell SD, Lin J, Mills JB, Xu JJ, et al. Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase inhibitors with ABCB1, ABCC2, and OATP1B1. *Drug Metab Dispos* 2005;33:537-46.
- [149] Trompier D, Baubichon-Cortay H, Chang XB, Maitrejean M, Barron D, Riordan JR, et al. Multiple flavonoid-binding sites within multidrug resistance protein MRP1. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2164-77.
- [150] Boumendjel A, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Perrotton T, Di PA. Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents. *Med Res Rev* 2005;25:453-72.
- [151] Dantzig AH, Grese TA, Norman BH, Palkowitz AD, Sluka JP, Starling JJ, et al., inventors; Benzothiphenes derivatives for treating resistant tumors. 773 217. 1997.
- [152] Norman BH, Gruber JM, Hollinshead SP, Wilson JW, Starling JJ, Law KL, et al. Tricyclic isoxazoles are novel inhibitors of the multidrug resistance protein (MRP1). *Bioorg Med Chem Lett* 2002;12:883-6.
- [153] Zhou XF, Coburn RA, Morris ME. Effects of new 4-aryl-1,4-dihydropyridines and 4-arylpyridines on drug efflux mediated by multidrug resistance-associated protein 1. *J Pharm Sci* 2005;94:2256-65.
- [154] Kawase M, Shah A, Gaveriya H, Motohashi N, Sakagami H, Varga A, et al. 3,5-dibenzoyl-1,4-dihydropyridines: synthesis and MDR reversal in tumor cells. *Bioorg Med Chem* 2002;10:1051-5.
- [155] Li L, Pan Q, Sun M, Lu Q, Hu X. Dibenzocyclooctadiene lignans: a class of novel inhibitors of multidrug resistance-associated protein 1. *Life Sci* 2007;80:741-8.

- [156] Wang S, Wan NC, Harrison J, Miller W, Chuckowree I, Sohal S, et al. Design and synthesis of new templates derived from pyrrolopyrimidine as selective multidrug-resistance-associated protein inhibitors in multidrug resistance. *J Med Chem* 2004;47:1339-50.
- [157] Wang S, Folkes A, Chuckowree I, Cockcroft X, Sohal S, Miller W, et al. Studies on pyrrolopyrimidines as selective inhibitors of multidrug-resistance-associated protein in multidrug resistance. *J Med Chem* 2004;47:1329-38.
- [158] Seprodi J, Sarkadi B, Hegedus T, Keri G, Orfi L, Idei M, et al., inventors; Soluble compounds for the inhibition of multidrug resistance and pharmaceutical compositions thereof. WO 02/20527 A1. 2002 Mar 14.
- [159] Minderman H, O'Loughlin KL, Pendyala L, Baer MR. VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Clin Cancer Res* 2004;10:1826-34.
- [160] Germann UA, Shlyakhter D, Mason VS, Zelle RE, Duffy JP, Galullo V, et al. Cellular and biochemical characterization of VX-710 as a chemosensitizer: reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro. *Anticancer Drugs* 1997;8:125-40.
- [161] Germann UA, Ford PJ, Shlyakhter D, Mason VS, Harding MW. Chemosensitization and drug accumulation effects of VX-710, verapamil, cyclosporin A, MS-209 and GF120918 in multidrug resistant HL60/ADR cells expressing the multidrug resistance-associated protein MRP. *Anticancer Drugs* 1997;8:141-55.
- [162] Sato W, Fukazawa N, Nakanishi O, Baba M, Suzuki T, Yano O, et al. Reversal of multidrug resistance by a novel quinoline derivative, MS-209. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995;35:271-7.
- [163] Vezmar M, Georges E. Reversal of MRP-mediated doxorubicin resistance with quinoline-based drugs. *Biochem Pharmacol* 2000;59:1245-52.
- [164] van Zanden JJ, Wortelboer HM, Bijlsma S, Punt A, Usta M, Bladeren PJ, et al. Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoid mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2. *Biochem Pharmacol* 2005;69:699-708.
- [165] van Zanden JJ, van der Woude H, Vaessen J, Usta M, Wortelboer HM, Cnubben NH, et al. The effect of quercetin phase II metabolism on its MRP1 and MRP2 inhibiting potential. *Biochem Pharmacol* 2007;74:345-51.
- [166] Surowiak P, Materna V, Kaplenko I, Spaczynski M, Dolinska-Krajewska B, Gebarowska E, et al. ABCC2 (MRP2, cMOAT) can be localized in the nuclear membrane of ovarian carcinomas and correlates with resistance to cisplatin and clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2006;12:7149-58.

- [167] Williams GC, Liu A, Knipp G, Sinko PJ. Direct evidence that saquinavir is transported by multidrug resistance-associated protein (MRP1) and canalicular multispecific organic anion transporter (MRP2). *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3456-62.
- [168] Agarwal S, Pal D, Mitra AK. Both P-gp and MRP2 mediate transport of Lopinavir, a protease inhibitor. *Int J Pharm* 2007;339:139-47.
- [169] Chakravarthi S, Jessop CE, Bulleid NJ. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep* 2006;7:271-5.
- [170] Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM, Marchan R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204:238-55.
- [171] Wortelboer HM, Balvers MGJ, Usta M, van Bladeren PJ, Cnubben NHP. Glutathione-dependent interaction of heavy metal compounds with multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Environ Toxicol Pharmacol* 2008;26:102-8.
- [172] Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969;27:502-22.
- [173] Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Bioflavonoid stimulation of glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Drug Metab Dispos* 2003;31:11-5.
- [174] Leslie EM, Bowers RJ, Deeley RG, Cole SP. Structural requirements for functional interaction of glutathione tripeptide analogs with the human multidrug resistance protein 1 (MRP1). *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:643-53.
- [175] Loe DW, Oleschuk CJ, Deeley RG, Cole SP. Structure-activity studies of verapamil analogs that modulate transport of leukotriene C(4) and reduced glutathione by multidrug resistance protein MRP1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:795-803.
- [176] Leslie EM, Mao Q, Oleschuk CJ, Deeley RG, Cole SP. Modulation of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) transport and atpase activities by interaction with dietary flavonoids. *Mol Pharmacol* 2001;59:1171-80.
- [177] Kawabe T, Chen ZS, Wada M, Uchiumi T, Ono M, Akiyama S, et al. Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett* 1999;456:327-31.
- [178] Pieck AC. *Pharmakokinetik und Platin-DNA-Adduktbildung von Oxaliplatin [Dissertation] Universität Bonn; 2004.*
- [179] Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, Devarakonda K, Kassack MU, Osmak M, et al. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol* 2007;73:298-307.

- [180] Chen ZS, Kawabe T, Ono M, Aoki S, Sumizawa T, Furukawa T, et al. Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter. *Mol Pharmacol* 1999;56:1219-28.
- [181] Evers R, Kool M, van Deemter L, Janssen H, Calafat J, Oomen LC, et al. Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J Clin Invest* 1998;101:1310-9.
- [182] Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact* 1998;111-112:1-14.
- [183] Fruehauf JP, Zonis S, al-Bassam M, Kyshtoobayeva A, Dasgupta C, Milovanovic T, et al. Melanin content and downregulation of glutathione S-transferase contribute to the action of L-buthionine-S-sulfoximine on human melanoma. *Chem Biol Interact* 1998;111-112:277-305.
- [184] Fruehauf JP, Zonis S, al-Bassam M, Kyshtoobayeva A, Dasgupta C, Milovanovic T, et al. Selective and synergistic activity of L-S,R-buthionine sulfoximine on malignant melanoma is accompanied by decreased expression of glutathione-S-transferase. *Pigment Cell Res* 1997;10:236-49.
- [185] Slot AJ, Wise DD, Deeley RG, Monks TJ, Cole SP. Modulation of human multidrug resistance protein (MRP) 1 (ABCC1) and MRP2 (ABCC2) transport activities by endogenous and exogenous glutathione-conjugated catechol metabolites. *Drug Metab Dispos* 2008;36:552-60.
- [186] Peklak-Scott C, Smitherman PK, Townsend AJ, Morrow CS. Role of glutathione S-transferase P1-1 in the cellular detoxification of cisplatin. *Mol Cancer Ther* 2008;7:3247-55.
- [187] Poch G, Brunner F, Kuhberger E. Construction of antagonist dose-response curves for estimation of pA₂-values by Schild-plot analysis and detection of allosteric interactions. *Br J Pharmacol* 1992;106:710-6.
- [188] Stein WD. Kinetics of the P-glycoprotein, the multidrug transporter. *Exp Physiol* 1998;83:221-32.
- [189] Dixon M. Graphical determination of equilibrium constants. *Biochem J* 1965;94:760-2.
- [190] www.relatedteaching.ust.hk/~ceng364/files/enzymes/Enzyme Inhibition Activation and Allosteric Kinetics.do. Enzyme kinetics. 2008.
- [191] El Sheikh AA, van den Heuvel JJ, Koenderink JB, Russel FG. Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/A. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320:229-35.
- [192] Klein P, Pawson T, Tyers M. Mathematical modeling suggests cooperative interactions between a disordered polyvalent ligand and a single receptor site. *Curr Biol* 2003;13:1669-78.

- [193] Segel IH. Enzyme kinetics. Wiley Classics Library Edition Published 1993 ed. New York: Wiley-Interscience; 1975.
- [194] Daoud R, Kast C, Gros P, Georges E. Rhodamine 123 binds to multiple sites in the multidrug resistance protein (MRP1). *Biochemistry* 2000;39:15344-52.
- [195] Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 2007;446:749-57.
- [196] Hamilton KO, Yazdanian MA, Audus KL. Modulation of P-glycoprotein activity in Calu-3 cells using steroids and beta-ligands. *Int J Pharm* 2001;228:171-9.
- [197] Letourneau IJ, Slot AJ, Deeley RG, Cole SP. Mutational analysis of a highly conserved proline residue in MRP1, MRP2, and MRP3 reveals a partially conserved function. *Drug Metab Dispos* 2007;35:1372-9.
- [198] Sterz K. Charakterisierung neuer MDR-Modulatoren und Entwicklung von Methoden zur Bestimmung der ATPase-Aktivität von P-Glykoprotein [Diploma thesis] Universität Bonn; 2006.
- [199] Lankelma J, Mulder HS, van Mourik F, Wong Fong Sang HW, Kraayenhof R, van Grondelle R. Cellular daunomycin fluorescence in multidrug resistant 2780AD cells and its relation to cellular drug localisation. *Biochim Biophys Acta* 1991;1093:147-52.
- [200] Meyer J. Untersuchung der Protein/Substrat-Interaktion an rekombinantem P-Glykoprotein [Dissertation] 2008.
- [201] Andrus MB. Polyene multi-drug resistance reversal agents. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2004;7:823-31.
- [202] Fox E, Bates SE. Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007;7:447-59.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Minimalanforderungen an einen ABC-Transporter, bestehend aus vier Domänen: Zwei membranüberspannenden Domänen und zwei Nukleotidbindungsdomänen.....	15
Abbildung 2: Topologie des „reversen“ Halbtransporters ABCG2.....	17
Abbildung 3: Topologie von P-gp oder ABCB1. Es zeigt einen typischen Aufbau eines Säugetier ABC-Transporters	20
Abbildung 4: Topologiemodell eines typischen „langen“ Vertreters der ABCC Subfamilie am Beispiel von MRP1. Mit „Y“ sind Glykosylierungen gekennzeichnet.	24
Abbildung 5: Modell des hypothetischen Transportzyklus der MRPs am Beispiel von MRP1. Abgebildet sind die hypothetischen Schritte. MSD1-NBD1 sind blau, während MSD2-NBD2 in violett dargestellt sind. MSD0 ist aus Einfachheitsgründen weggelassen worden Mit „?“ gekennzeichnete Pfeile stellen noch nicht bewiesene, potentielle Wege dar, die aus der inaktiven NBD resultieren. Aus [33].	25
Abbildung 6: Topologiemodell für MRP2 nach Koenig et al. mit nur vier transmembranären Helices in MSD2 [58].	28
Abbildung 7: Reaktion von 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluoresceindiacetat zum 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein, dem fluoreszierenden Agens.	57
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Calcein-AM Akkumulations-Assays für MRP1 und MRP2.	63
Abbildung 9: Pipettierschema eines standardmäßigen Calcein-AM-Akkumulations-Assays. Je nach Versuchsanordnung konnte die Wildtypzelllinien durch die transfizierte Zelllinie ersetzt werden. KHP wurde anstatt der Zellsuspension in jede dritte Spalte einpipettiert, um die Eigenfluoreszenz der Substanzen zu überprüfen.....	65
Abbildung 10: Pipettierschema für einen Kombinationsassay. Während von links nach rechts die i. d. Regel die Aktivator-Konzentration (gelb) steigt, steigt die Inhibitor-Konzentration (blau) von oben nach unten.....	66
Abbildung 11: Reaktionsgleichung des MTT-Assays	68
Abbildung 12: Pipettierschema für den MTT-Assay. Weiß unterlegte Wells wurden nur mit Medium gefüllt. Blau unterlegt sind Wells mit der transfizierten Zelllinie, gelb mit der Wildtypzelllinie.	69
Abbildung 13: Derivatisierungsreaktion von Glutathion mit Naphthalendialdehyd (NDA) zum fluoreszierende Isoindoladdukt.....	77
Abbildung 14: Disulfidbrücken Reduktion durch DTT.	77

Abbildung 15: Pipettierschema für einen typischen Glutathion-Assay, mit den verschiedenen verwendeten Volumina.	79
Abbildung 16: Beispiele für Western Blots. A: Mit MRP1 Antikörper, B: Mit MRP2 Antikörper, C und D: Mit P-gp Antikörper angefärbt. Die Größeneinordnung (kDa) ergab sich aus dem mitgelaufenen Größenstandard.	88
Abbildung 17: Fluoreszenz-Zeitdiagramme für den CDFD-Assay für die Zelllinienpaare MDCKII MRP2 und MDCKII (oben) und 2008 MRP2 und 2008 (unten). Links bei einer CDFD - Konzentration von 1,0 $\mu\text{mol/l}$ und rechts mit 0,5 $\mu\text{mol/l}$. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardfehler eines repräsentativen Experiments einer Dreifachbestimmung.....	90
Abbildung 18: Fluoreszenz-Zeit-Diagramme von MDCKII MRP2 und MDCKII Zellen mit und ohne Zusatz von 10 $\mu\text{mol/l}$ Natriumazid. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Dreifachbestimmung aus einer Serie von zwei unabhängigen Versuchen.	91
Abbildung 19: Fluoreszenz-Zeit-Kurven für Indometacin in MDCKII MRP2 Zellen. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines repräsentativen Experiments als Dreifachbestimmung.....	92
Abbildung 20: Dosis-Wirkungskurve für Indometacin im CDFD-Assay. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines repräsentativen Experiments als Dreifachbestimmung, aus einer Serie von mindestens drei unabhängigen Versuchen.	92
Abbildung 21: Standardinhibitoren Probenecid (oben) und Sulfinpyrazon (unten) von MRP2 im CDFD-Assay. Links Fluoreszenz-Zeit Verläufe und rechts Dosis-Wirkungskurven. Abgebildet sind jeweils Mittelwert und Standardfehler eines repräsentativen Experiments als Dreifachbestimmung. Das Maximum der Dosis-Wirkungskurve von Sulfinpyrazon wurde über den Maximalwert von Indometacin festgelegt.	93
Abbildung 22: Fluoreszenz-Zeit-Diagramm in Anwesenheit verschiedener Indometacin-Konzentrationen in 2008 MRP1 Zellen. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung.	94
Abbildung 23: Dosis-Wirkungskurve von Indometacin in 2008 MRP1 Zellen und Wildtyp Zellen. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments mit Doppelbestimmung.	95
Abbildung 24: Strukturformel von RB_I_009b.....	96
Abbildung 25: Dosis-Wirkungskurve von RB_I_009b in 2008 MRP1 bzw. 2008 WT Zellen ohne Zusatz von XR9577.(links) und nach Zusatz von XR9577 (rechts). Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung.	96
Abbildung 26: Dosis-Wirkungskurve von RB_I_009b in A2780 ADR und WT Zelllinie. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von n = 3 unabhängigen Experimenten.....	97

Abbildung 27: Dosis-Wirkungskurve von Indometacin in Anwesenheit des selektiven P-gp-Blockers XR9577. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines repräsentativen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n > 3$ Experimenten.	98
Abbildung 28: Korrelation nach Pearson der gemessenen und aus der Literatur bekannten pIC_{50} -Werte aus [125], bzw. MK571 [126]. Das R^2 beträgt 0,911 und die Wahrscheinlichkeit, dass die Daten nicht korrelieren liegt nach Pearson bei $p=0,0002$	99
Abbildung 29: Residual-Plot der gemessenen Werte gegenüber der Ausgleichsgeraden. Hier wird deutlich, dass besonders Verapamil von der Ausgleichsgeraden abweicht ($> 0,4$ logarithmische Einheiten).	100
Abbildung 30: Fluoreszenz-Zeit Diagramm von verschiedenen Indometacin-Konzentrationen in MDCKII MRP1 Zellen. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von mindestens drei Experimenten.	101
Abbildung 31: A: Dosis-Wirkungskurve von Indometacin in MDCKII MRP1 und MDCKII Zellen. Ab einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ Indometacin verlaufen die zwei Kurven in etwa parallel. B: Ausschnitt aus A. Zweite Dosis-Wirkungskurve. Wildtyp und transfizierte Zelllinie treffen sich im Maximum. Abgebildet sind Dosis-Wirkungskurven eines typischen Experiments als Vierfachbestimmung aus einer Serie von mindestens drei unabhängigen Experimenten.	101
Abbildung 32: Oben: Fluoreszenz-Zeit-Diagramm von verschiedenen Indometacin Konzentrationen in MDCKII MRP2 Zellen. Unten: Resultierende Dosis-Wirkungskurve im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experimentes als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n > 3$ Experimenten. Auffällig ist eine leichte Aktivierung des Calcein Effluxes zu Beginn der Messung (vergl. Kapitel 4.11).	103
Abbildung 33: Allgemeiner Aufbau einer LM-Verbindung. X = Sauerstoff (O) oder Iminfunktion (NH); Y = Keton (=O), Hydroxygruppe (-OH) oder Säureamid (-CONH-R ₂); R ₁ und R ₂ = verschiedene aliphatische und aromatische (auch substituierte) Reste.	105
Abbildung 34: Dosis-Wirkungskurven für LM 20.5 gemessen im Calcein-AM Akkumulationsassay in MRP1 (links) bzw. MRP2 (rechts) transfizierten Zellen. Dargestellt ist jeweils ein typisches Experiment als Doppelbestimmung aus einer Serie von mindestens drei unabhängigen Experimenten.	106
Abbildung 35: Korrelation der pIC_{50} -Werte von MRP1 gegen die pIC_{50} -Werte von MRP2. Es besteht eine hohe Korrelation zwischen den Aktivitäten der beiden Proteine mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,949.	106
Abbildung 36: Korrelation der errechneten log P-Werte gegen die Aktivitätsdaten. Es besteht ein nach Pearson hochsignifikanter ($p=0,0005$) Zusammenhang zwischen den log P-Werten und den pIC_{50} -Werten, $R^2=0,569$	114
Abbildung 37: Graphische Zusammenfassung der erhaltenen Struktur-Wirkungsbeziehungen für die LM-Verbindungen.	115

Abbildung 38: Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve von LM 20.17 an P-gp in A2780 ADR und A2780 WT Zellen. Dargestellt ist die Dosis-Wirkungskurve eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von n = 3 unabhängigen Experimenten.	117
Abbildung 39: Korrelation der Aktivitätsdaten zwischen MRP1 und P-gp nach Pearson. Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0,386. Beim Weglassen von LM 20.3 aus der Korrelation erhöht sich das Bestimmtheitsmaß auf 0,571. LM 20.3 (blau) ist ein signifikanter Ausreißer ($p < 0,05$).	119
Abbildung 40: Korrelation der Aktivitätsdaten für P-gp gegen die errechneten log P-Werte. Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,338$	120
Abbildung 41: Lennard-Jones- und Coulomb-Potential-Verlauf, die zur Beschreibung von zwischenmolekularen Wechselwirkungen in der CoMFA herangezogen werden (nach [138]).	121
Abbildung 42: Vergleich der in der CoMFA verwendeten Potentiale mit der in der CoMSIA verwendeten Gauß-Kurve (nach [138]).	122
Abbildung 43: Alignment der für die 3D-QSAR verwendeten Strukturen. Aus Übersichtsründen wurden die Wasserstoffatome weggelassen. Gut zu erkennen ist, dass der Phenylring der Verbindung LM 20.0 deutlich aus der Ebene herausragt (Pfeil).	124
Abbildung 44: Graphische Auswertung des erhalten CoMSIA-Modells auf Basis der sterischen Eigenschaften der Moleküle für MRP1. Gezeigt ist LM 20.5, die beste Testsubstanz im MRP1-Assay. Gelb: Sterisch ungünstig; grün: Sterisch begünstigt.	126
Abbildung 45: A: Korrelation zwischen gemessenen und durch das sterische LOO-CoMSIA-Modell für die entsprechenden Substanzen vorhergesagten pIC_{50} -Werte für MRP1. Die Aktivität der hervorgehobenen Substanzen wich mehr als 0,4 logarithmische Einheiten von den experimentell ermittelten Werten ab. Abbildung B zeigt die als Residuum bezeichnete Differenz zwischen experimentellen und vorhergesagten Werten.	127
Abbildung 46: Graphische Auswertung des sterischen CoMSIA-Modells auf Basis der sterischen Eigenschaften der Moleküle für MRP2. Gezeigt ist LM 20.5, die beste Testsubstanz im MRP2-Assay. Gelb: Sterisch ungünstig; grün: Sterisch begünstigt.	128
Abbildung 47: Korrelation zwischen gemessenen und durch das sterische LOO-CoMSIA-Modell für die entsprechenden Substanzen vorhergesagten pIC_{50} -Werte für MRP2. Die Aktivität der hervorgehobenen Substanzen wich mehr als 0,4 logarithmische Einheiten von den experimentell ermittelten Werten ab. Abbildung B zeigt die als Residuum bezeichnete Differenz zwischen experimentellen und vorhergesagten Werten.	129
Abbildung 48: Graphische Auswertung des erhalten CoMSIA-Modells auf Basis der sterischen Eigenschaften der Moleküle für P-gp. Gezeigt ist zur besseren Vergleichbarkeit wieder LM 20.5. Gelb: Sterisch ungünstig; grün: Sterisch begünstigt.	131
Abbildung 49: A: Korrelation zwischen gemessenen und durch das sterische LOO-CoMSIA-Modell für die entsprechenden Substanzen vorhergesagten pIC_{50} -Werte für P-gp. Keine der Substanzen wich mehr als 0,4 logarithmische Einheiten von den experimentellen Daten ab. Die	

hervorgehobene Substanz ist die mit der größten Abweichung von den gemessene pIC_{50} -Werten ($> 0,25$ logarithmischen Einheiten). Abbildung B zeigt die als Residuum bezeichnete Differenz zwischen experimentellen und vorhergesagten Werten.	131
Abbildung 50: Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve von Gü 658 an MRP1 in 2008 MRP1 und WT Zellen. Dargestellt ist eine Dosis-Wirkungskurve eines repräsentativen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.	133
Abbildung 51: Korrelation der gemessenen pIC_{50} -Werte der Gü-Verbindungen und der errechneten log P-Werte. Das Bestimmtheitsmaß R^2 beträgt 0,457.	141
Abbildung 52: Alignment aller an MRP1 Zellen aktiven Gü-Verbindungen und das daraus entstandene Pharmakophormodell. Es gibt die Minimalanforderungen an einen MRP1-Inhibitor der Gü-Verbindungsklasse wider. Orange: π -Elektronensystem; blau: Wasserstoffbrücken-Akzeptor; grün: Hydrophobes-Zentrum; Magenta: Wasserstoffbrücken-Akzeptor; grau: Wasserstoffbrücken Donor und Akzeptor.	142
Abbildung 53: Graphische Zusammenfassung der Struktur-Wirkungsbeziehungen der Gü-Verbindungen.	143
Abbildung 54: Dosis-Wirkungskurve von E ₂ 17G im Calcein-AM-Assay für MRP2. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n > 3$ unabhängigen Experimenten.	144
Abbildung 55: Dosis-Wirkungskurve von Gü 658 im Calcein-AM-Assay für MRP2. Gü 658 zeigt eine ähnliche Aktivierungskurve wie E ₂ 17G. Bei hohen Konzentrationen kommt es wieder zur Inhibition. Abgebildet ist ein typisches Experiment einer Doppelbestimmung aus einer Serie von $n > 3$ Experimenten. Ab einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ beginnt Gü 658 den Transport zu inhibieren.	144
Abbildung 56: Darstellung der Aktivitätsdaten der Gü-Verbindungen aus der MRP1- mit den Daten aus der MRP2-Testung.	146
Abbildung 57: Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve von Gü 83 an MRP2. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n > 3$ unabhängigen Experimenten.	149
Abbildung 58: Aktivitätsdaten ausgewählter Vertreter der p-Aminobenzoesäure-Derivate und ihre inhibitorische Wirkung an P-gp im Vergleich zu Verapamil. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 unterschiedlichen Versuchen jeweils als Doppelbestimmung.	150
Abbildung 59: Strukturformeln bekannter MRP1 Inhibitoren.	152
Abbildung 60: Strukturformel eines selektiven MRP1 Inhibitors.	153
Abbildung 61: Strukturformeln einiger Dual-Inhibitoren für MRP1 und P-gp.	154
Abbildung 62: Strukturformeln bekannter MRP2 Inhibitoren.	155

Abbildung 63: Fluoreszenz-Zeit-Diagramme des fluoreszierenden Isoindoladduktes aus GSH und NDA bei verschiedenen GSH Konzentrationen. Links ohne Zusatz von DTT, rechts mit DTT eines typischen Experiments als Doppelbestimmung.	157
Abbildung 64: Kalibriergeraden zur intrazellulären GSH-Bestimmung eines typischen Experiments als Doppelbestimmung. Bestimmtheitsmaß R^2 für die Gerade ohne DTT betrug 0,998 und für die Gerade mit DTT 0,990.	158
Abbildung 65: Beispielkurven für eine intrazelluläre GSH-Bestimmung in MDCKII MRP2 Zellen mit (■) und ohne (●) Zusatz von DTT. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Versuches als Doppelbestimmung.	159
Abbildung 66: Ermittelte intrazelluläre GSH-Level pro 10^6 Zellen der entsprechenden MDCKII-Zelllinien ohne Zusatz von DTT. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei Experimenten.	160
Abbildung 67: Ermittelte intrazelluläre GSH-Level pro 10^6 Zellen der entsprechenden MDCKII-Zelllinien mit Zusatz von DTT. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei Experimenten.	160
Abbildung 68: Intrazelluläre GSH-Level ermittelt von Wortelboer et al. (modifiziert nach [171]).	161
Abbildung 69: Fluoreszenz-Zeit Diagramm der Fluoreszenzzunahme der Derivatisierungsreaktion von NDA mit heraus transportiertem GSH in 2008 MRP1 Zellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.	162
Abbildung 70: Dosis-Wirkungskurve des durch Verapamil stimulierten Glutathion-Effluxes in MDCKII MRP1 und MDCKII Wildtyp Zellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.	163
Abbildung 71: Dosis-Wirkungskurve des durch Verapamil stimulierten Glutathion-Effluxes in 2008 MRP1 und 2008 Wildtyp Zellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.	163
Abbildung 72: Dosis-Wirkungskurve des durch Apigenin stimulierten GSH-Effluxes. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments einer Doppelbestimmung aus einer Serie von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.	164
Abbildung 73: Erhöhung des Glutathion-Effluxes der ausgewählten Modulatoren als Faktor. Nur Verapamil und Apigenin erhöhen den Glutathion-Efflux signifikant ($p < 0,05$).	166
Abbildung 74: Dosis-Wirkungskurve von Gü 83 in einer linearen Auftragungsweise. In dieser wird besonders die spätere Abnahme des Glutathion-Effluxes deutlich. Darstellung eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.	167

Abbildung 75: Strukturformeln einiger den Glutathion-Efflux steigernder Substanzen.	167
Abbildung 76: MTT-Assay von MDCKII MRP2 und MDCKII gegenüber Cisplatin. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung von n=3 Experimenten jeweils als Dreifachbestimmung nach Normalisierung.	169
Abbildung 77: Platinaufnahme der Zelllinien MDCKII MRP2 und MDCKII WT über die Zeit. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.	170
Abbildung 78: Cisplatinaufnahme über die Zeit in An- und Abwesenheit des MRP2 Inhibitors Indometacin. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.	171
Abbildung 79: Platingehalt der Zellen in ng/ml pro mg Gesamtprotein zum Zeitpunkt 120 min. Der t-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede in den Platinkonzentrationen. ns = nicht signifikant.	172
Abbildung 80: Intrazelluläres Glutathion-Level pro 1 Millionen Zellen vor und nach Inkubation mit 100 µmol/l BSO über 48 h. Die Unterschiede in den Glutathionspiegeln sind mit $p < 0,0001$ signifikant unterschiedlich in den behandelten und unbehandelten Zellen ($n \geq 3$).	173
Abbildung 81: Effekt des BSO induzierten Glutathionmangels auf die Aufnahme von Cisplatin, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.	174
Abbildung 82: Platingehalt der Zellen in ng/ml pro mg Gesamtprotein zum Zeitpunkt 120 min. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den unbehandelten und behandelten Zellpaarungen. ns = nicht signifikant.	175
Abbildung 83: Glutathion Efflux in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen Cisplatin. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung.	176
Abbildung 84: Prozentualer Glutathion Efflux aus MDCKII Zelllinien im Prozent von der Kontrolle ohne Cisplatin. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen.	176
Abbildung 85: Aktivierungs- und Inhibitionskurve für Indometacin im Calcein-AM-Assay für MRP2. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von $n > 3$ unabhängigen Experimenten. Der Hill-Koeffizient der Aktivatorkurve ist 1, während die Inhibitorcurve einen Hillkoeffizienten von 2,117 hat.	178
Abbildung 86: Typisches Experiment mit als Doppelbestimmung eines Kombinations-Assays mit E ₂ 17G und LM 20.8. Mit zunehmender Aktivator-Konzentration kommt es zur Rechtsverschiebung der Inhibitions-Kurven.	179

Abbildung 87: Typisches Experiment als Doppelbestimmung eines Kombinations-Assays mit E ₂ 17G und Indometacin. Trotz zunehmender Aktivator-Konzentration kommt es zu fast keiner Verschiebung der Inhibitions-Kurven.....	179
Abbildung 88: Dose-Ratio-Auswertung verschiedener Kombinationsassays durchgeführt in MRP2 transfizierten MDCKII-Zellen. Die Dose-Ratio-Kurven entsprechen im Wesentlichen den Aktivator-Kurven des verwendeten Aktivators. Abgebildet sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von n = 3 unabhängigen Versuchen.....	181
Abbildung 89: Dixon-Plots von LM 20.8 in Abhängigkeit von der E ₂ 17G-Konzentration. Oben: normale Auftragungsweise mit parabelförmigen Kurvenverlauf. Unten: Nach Quadrierung der LM 20.8 Konzentration entstehen Geraden. Abgebildet sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von mindestens drei unabhängigen Versuchen.....	183
Abbildung 90: Zur Bestätigung das n = 2 wurden noch Dixon-Plots für n = 3 (links) und n=1,2 (rechts) erstellt. Während für n = 3 Sättigungskurven ermittelt wurden, blieb für n = 1,2 die Parabel erhalten.	184
Abbildung 91: Dixon-Plot von E ₂ 17G in Abhängigkeit von der LM 20.8 Konzentration. Aufgrund der aktivierenden Wirkung des E ₂ 17G schneiden sich die Geraden im oberen rechten Quadranten des Koordinatensystems. Abgebildet ist der Mittelwert eines typischen Experiments als Doppelbestimmung aus einer Serie von n ≥ 3 Wiederholungen. Oben Anzahl der Bindungsstellen n = 1 unten n = 2. Durch Quadrierung ergibt sich ein nicht linearer Verlauf.....	185
Abbildung 92: Alle möglichen Interaktionen zwischen einem Aktivator (A), einem Inhibitor (I) und einem Substrat (S) mit dem Transporter (E). Schritt 1: Einstellung des Gleichgewichts zwischen E, A und I. Schritt 2: Nach Zugabe von S wird die Transportgeschwindigkeit analog zum eingestellten Gleichgewicht in Schritt 1 verändert (Schritt 3). Modifiziert nach [193]. Das Modell ist jedoch nicht ausreichend das tatsächliche Interaktionsschema widerzuspiegeln. ...	187
Abbildung 93: Konzentrations-Geschwindigkeits-Diagramm von E ₂ 17G in Abhängigkeit von der Indometacin-Konzentration. Oben: mit normalen Indometacin-Konzentrationen. Unten: Mit quadrierten Konzentrationen. Deutlich zu erkennen ist, dass die Kurvenanpassung unten ($R^2 = 0,971$) deutlich besser ist als oben ($R^2 = 0,880$). Abgebildet ist der Mittelwert eines typischen Experiments aus einer Serie von n ≥ 3 Wiederholungen.....	190
Abbildung 94: Konzentrations-Geschwindigkeits-Diagramm von Gü 658 in Abhängigkeit von der LM 20.8-Konzentration. Oben: Mit „normalen“ LM 20.8-Konzentrationen. Unten: Mit quadrierten Konzentrationen. Deutlich zu erkennen ist, dass die Kurvenanpassung unten ($R^2 = 0,952$) deutlich besser ist als oben ($R^2 = 0,685$). Während oben eine nichtkompetitive Interaktion vorhergesagt wird, zeigt das bessere Modell (unten) eine kompetitive Interaktion der beiden Substanzen. Abgebildet ist der Mittelwert eines typischen Experiments aus einer Serie von n ≥ 3 Wiederholungen.	191

Abbildung 95: Konzentrations-Geschwindigkeits-Diagramm für Indometacin in Abhängigkeit von der Gü 83-Konzentration. Es zeigt sich ein typischer nichtkompetitiver Kurvenverlauf ($R^2 = 0,954$). Abgebildet ist der Mittelwert eines typischen Experiments aus einer Serie von $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten.	192
Abbildung 96: Konzentrations-Geschwindigkeits-Diagramm für E ₂ 17G in Abhängigkeit von den LM 20.8-Konzentrationen. Gezeigt wird ein typischer kompetitiver Kurvenverlauf ($R^2 = 0,931$). Abgebildet ist der Mittelwert eines typischen Experiments aus einer Serie von $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten.	192
Abbildung 97: Konzentrations-Geschwindigkeits-Diagramm für Gü 658 in Abhängigkeit von der Gü 83-Konzentration. Gezeigt wird ein typischer nichtkompetitiver Kurvenverlauf ($R^2 = 0,954$). Abgebildet ist der Mittelwert eines typischen Experiments aus einer Serie von $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten.	193
Abbildung 98: Bindungsregionen-Modell modifiziert nach Higgins [195]. Eine einzelne, große Bindungsregion (hellblau) kann Verbindung A (Punkt 1), Verbindung B (Punkt 2) oder Verbindung C (Punkt 3) separat binden. Des Weiteren kann sie A und B gemeinsam binden (Punkt 4), entsprechend wie pharmakologisch unterschiedliche Bindungsstellen, ist aber nicht in der Lage A und C gleichzeitig einzulagern (Punkt 5), wie pharmakologisch gleiche Bindungsstellen.	195
Abbildung 99: Vergleich der Strukturformeln, der um die E ₂ 17G Bindungsstelle konkurrierenden Verbindungen mit E ₂ 17G.	196
Abbildung 100: Exemplarische Dosis-Wirkungskurve für Indometacin im CDFD Assay fürs FACS. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung von einem typischen Experiment mit drei Replikaten aus einer Serie von $n > 3$ unabhängigen Versuchen.	239
Abbildung 101: Vergleich der Mittelwerte (<i>t</i> -test) der gemessenen pIC ₅₀ -Werten für Indometacin miteinander sowie mit dem Literaturwert aus [129]. Alle pIC ₅₀ -Werte sind nicht signifikant (ns) verschieden ($p < 0,05$).	239
Abbildung 102: Fluoreszenz-Zeit-Diagramme für die Zelllinie A2780 ADR mit verschiedenen Verapamilkonzentrationen. Mit zunehmender Modulatorkonzentration sinkt die Daunorubicin-Fluoreszenz.	241
Abbildung 103: Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve aus dem Daunorubicin-Efflux-Assays für Verapamil in A2780 ADR und Wildtypzellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung eines typischen Experiments einer Doppelbestimmung aus einer Serie von 2 unabhängigen Versuchen.	241
Abbildung 104: Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve aus dem Daunorubicin-Efflux-Assays für Indometacin in MDCKII MRP2 und Wildtypzellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments einer Doppelbestimmung aus einer Serie von 2 unabhängigen Versuchen.	242

Abbildung 105: Graphische Auswertung des erhalten CoMFA-Modells für MRP1 auf Basis der sterischen Eigenschaften der Moleküle. Eingebettet ist LM 20.5, die beste Testsubstanz im Assay. Gelb: sterisch ungünstig; grün: sterisch begünstigt.	243
Abbildung 106: Korrelation zwischen gemessenen und durch das sterische LOO-CoMFA-Modell für die jeweils weggelassenen Verbindung vorhergesagten pIC_{50} -Werte für MRP1.....	243
Abbildung 107: Graphische Auswertung des erhalten CoMFA-Modells für MRP2 auf Basis der sterischen Eigenschaften der Moleküle. Eingebettet ist LM 20.5, die beste Testsubstanz im Assay. Gelb: sterisch ungünstig; grün: sterisch begünstigt.	244
Abbildung 108: Korrelation zwischen gemessenen und durch das sterischen LOO-CoMFA-Modell für die jeweils weggelassenen Verbindung vorhergesagten pIC_{50} -Werte für MRP2.....	244
Abbildung 109: Graphische Auswertung des erhalten CoMFA-Modells für ABCB1 auf Basis der sterischen Eigenschaften der Moleküle. Eingebettet ist LM 20.5, die beste Testsubstanz im Assay. Gelb: Sterisch ungünstig; grün: sterisch begünstigt.....	245
Abbildung 110: Korrelation zwischen gemessenen und durch das sterische LOO-CoMFA-Modell für die jeweils weggelassenen Verbindung vorhergesagten pIC_{50} -Werte für ABCB1..	245
Abbildung 111: Zytotoxizitäts-Ergebnisse ausgewählter LM-Verbindungen. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung von n=2 Experimenten als Doppelbestimmung.	246
Abbildung 112: Zytotoxizitäts-Ergebnisse ausgewählter Gü-Verbindungen (A,B). Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung von n=2 Experimenten jeweils als Doppelbestimmung.	247
Abbildung 113: Aktivität der Gü-Verbindungen an P-gp (A-D) im Vergleich zum Standard Verapamil. Abgebildet ist der Mittelwert eines typischen Experiments mit zwei Replikaten. .	248
Abbildung 114: Strukturformel von 150E.....	250
Abbildung 115: Dosis-Wirkungskurve von 150E im MTT-Assay in A2780 ADR (■) und A2780 (●). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.	250
Abbildung 116: Dosis-Wirkungskurve von 150E im MTT-Assay in A2780 ADR (■) und A2780 (●) in Anwesenheit (offene Symbole) oder Abwesenheit (geschlossene Symbole) von 150E. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments mit 3 Replikaten aus einer Serie von 3 unabhängigen Experimenten.....	251

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Subfamilien der humanen ABC-Transporter mit der Anzahl ihrer Mitglieder. Gelb unterlegt sind die Familien, deren Mitglieder eine Rolle in der Krebstherapie und in der Ausbildung von Resistenzen spielen.	16
Tabelle 2: Zusammenstellung von P-gp Substraten und Modulatoren (modifiziert nach [24])...	21
Tabelle 3: Lokalisation und Rolle der ABCC Subfamilie in der Krebs- und Chemotherapie nach [1] und [33].....	26
Tabelle 4: MRP1 Substrate und ihre Abhängigkeit von Metabolisierung und Glutathion nach [61].....	30
Tabelle 5: Ausgesuchte MRP2 Substrate (modifiziert nach [71]).....	31
Tabelle 6: Inhibitoren für MRP1, die in klinischen Studien erprobt werden und wurden. Modifiziert nach [27].	33
Tabelle 7: Zusammensetzung Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS) 1 x.....	38
Tabelle 8: Zusammensetzung des Krebs-HEPES-Puffers (KHP) 5 x.....	39
Tabelle 9: Zusammensetzung HEPES-Stammlösung (200 mmol/l, pH 7,4)	44
Tabelle 10: Zusammensetzung Homogenisationspuffer (Puffer 1).....	44
Tabelle 11: Zusammensetzung Storage (Puffer 2)	45
Tabelle 12: Einstellungen der Elektrophorese-Kammer für die SDS-PAGE.....	54
Tabelle 13: Einstellungen der Elektrophoresekammer für den Western Blot	55
Tabelle 14: Liste der verwendeten Antikörper. Alle Antikörper wurden bei Chemicon® International erworben.	56
Tabelle 15: Einstellungen des FACS®-Calibur für den CDFD-Assay im Röhrchen.....	58
Tabelle 16: Einstellungen des FACS®-Calibur für den Microplate CDFD-Assay.....	59
Tabelle 17: Testparameter für den Daunorubicin-Efflux Assays mittels Microplatereader	62
Tabelle 18: Einstellungen der Microplatereader am Beispiel des POLARstar®	65
Tabelle 19: Testparameter für den MTT-Assay im POLARstar®	70
Tabelle 20: Verdünnungen zur Erstellung der Kalibriergeraden durchgeführt durch den Autosampler des Atomabsorptionsspektrometers.....	74
Tabelle 21: Hergestellte Process Quality Controls (PQC)-Proben, die benötigten Volumenangaben der Cisplatin-AL beziehen sich auf ein Volumen von 10 ml	74
Tabelle 22: Temperatur- und Zeitprogramm zur Platinbestimmung mittels AAS unterteilt in 12 Schritte	75

Tabelle 23: Verdünnungsschritte zur Herstellung der Kalibriergeraden zur halbquantitativen Bestimmung von intrazellulärem Glutathion	78
Tabelle 24: Testparameter für die intrazelluläre Glutathion-Bestimmung im Microplatereader	79
Tabelle 25: Einstellungen des POLARstars bei der Bestimmung des extrazellulären Glutathions.	80
Tabelle 26: Relative Häufigkeit der häufigsten Resistenzproteine in Hundenieren im Vergleich zur menschlichen Niere nach Conrad et al. [112]. Für MRP2 standen keine Ergebnisse auf Proteinebene zur Verfügung, sodass Ergebnisse auf RNA-Ebene angegeben wurden. Modifiziert nach [112].	87
Tabelle 27: Tabelle bekannter MRP1 Inhibitoren mit ihren pIC_{50} Werten (aus [125], bzw. MK571 aus [126]) mit den in diesem Assay gemessenen Werten.	99
Tabelle 28: Vergleich von MRP1 Inhibitoren im Calcein-AM-Assay in den verschiedenen Zelllinien 2008 MRP1 und MDCKII MRP1. Alle Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten. Flurbiprofen ist ein bekannter Inhibitor für MRP1 [121, 128].....	102
Tabelle 29: pIC_{50} Werte einiger Standardinhibitoren von MRP2 im Vergleich zu Literaturdaten aus [129].....	104
Tabelle 30: Strukturformeln aller inhibitorisch wirkender LM-Verbindungen.	107
Tabelle 31: Strukturformeln aller im MRP1 und MRP2 Calcein-AM-Assay inaktiven oder toxischen Verbindungen.	110
Tabelle 32: Biologische Aktivität der LM-Verbindungen an P-gp.....	117
Tabelle 33: Ergebnisse der COMFA und COMSIA für MRP1 mit Validierung durch das Leave One Out (LOO) Verfahren und ohne Validierung.....	125
Tabelle 34: Ergebnisse der CoMFA und CoMSIA für MRP2 mit Validierung durch das Leave One Out (LOO) Verfahren und ohne Validierung.....	128
Tabelle 35: Ergebnisse der CoMFA und CoMSIA für P-gp mit Validierung durch das Leave One Out (LOO) Verfahren und ohne Validierung.	130
Tabelle 36: Ergebnisse der Leave-Many-Out-Validierung besten 3D-QSAR-Modelle.	132
Tabelle 37: Strukturformeln und biologische Aktivität aller getesteten 2-Ureidobenzoessäuren	134
Tabelle 38: Strukturformeln und biologische Aktivität aller getesteten Benzoessäuren mit einer Thioharnstoffteilstruktur	136
Tabelle 39: Strukturformeln und biologische Aktivität aller getesteten 2-Ureidothiophen-3-Carbonsäuren.	137

Tabelle 40: Strukturformeln und biologische Aktivität aller getesteten ortho-Thioureidocarbonsäuren.....	139
Tabelle 41: Aktivitätsdaten für alle an MRP2 getesteten Gü-Verbindungen.....	145
Tabelle 42: Strukturformeln aller aktiven und inaktiven Substanzen vom p-Aminobenzoessäuretyp.....	147
Tabelle 43: Mittelwert, Standardabweichung und relativer Fehler aller Qualitätskontrollen. ..	156
Tabelle 44: Mittelwert, Standardabweichung und relativer Fehler aller PQC-Proben.	170
Tabelle 45: Darstellung der durchgeführten Kombinationsassays im Calcein-AM-Assay für MRP2	178
Tabelle 46: Vergleich der pIC ₅₀ -Werte aus der Dose-Ratio-Auswertung mit der pIC ₅₀ des entsprechenden Aktivators alleine. Die pIC ₅₀ -Werte sind nicht signifikant verschieden (p > 0,05).....	180
Tabelle 47: Auflistung aller durchgeführten Kombinationsassays und den ermittelten Interaktionstypen. Blauhinterlegt im gemessenen Konzentrationsbereich im Assay Aktivator. Gelbhinterlegt sowohl Inhibitor als auch Aktivator. Grauhinterlegt reiner Inhibitor.	192
Tabelle 48: Auswahl unwirksamer Gü-Verbindungen aus [142]	249

9 Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atom-Absorptionsspektroskopie/-meter
ABC	ATP-Binding-Cassette
ADP	Adenosindiphosphat
AL	Arbeitslösung
AM	Acetoxymethylester
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast-Cancer-Resistance-Protein
BSA	Bovines Serum Albumin
BSO	Buthionsulfoxim
CDFD	5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluoresceindiacetat
CDF	5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CoMFA	Comparative Molecular Field Analysis
CoMSIA	Comparative Molecular Similarity Indices Analysis
Dest.	Destilliert
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	die Konzentration einer Substanz, die notwendig ist, für eine 50 prozentige Aktivierung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E ₂ 17G	β-Estradiol-17-β-D-Glukuronid
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FKS	Fötales Kälberserum
FSC	Forward Angle Scatter
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IC ₅₀	die Konzentration einer Substanz, die notwendig ist, für eine 50 prozentige Inhibition
LOO	Leave-One-Out-Kreuzvalidierung
k. E.	kein Effekt
KHP	Krebs-HEPES-Puffer
LMO	Leave-Many-Out-Kreuzvalidierung
MDR	Multidrug-Resistenz
MRP	Multidrug Resistance Associated Protein
MSD	Membrane Spanning Domain
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

NBD	Nukleotid-Bindungs-Domäne
n. d.	Nicht durchgeführt
NDA	2,3-Naphthalendicarboxaldehyd
PAP	Probenauftragspuffer
PBS	Phosphat-Buffered-Saline
P-gp	P-Glykoprotein (ABCB1)
PLS	Partial Least Squares
PQC	Process-Quality-Control
PVDF	Polyvinylidendifluorid
P/S	Penicillin/Streptomycin
QSAR	Quantitative-Struktur-Wirkungsbeziehung
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SL	Stammlösung
SSC	Side Scatter
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembranäre Helice
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
vergl.	vergleiche
w.E.	willkürliche Einheit
WT	Wildtyp

10 Anhang

10.1 Zellkultur- und Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller/Firma	Artikelnummer
1,5 Natural Flat Cap Micro centrifuge Tubes	Starlab	S1615-5500
1,5 Amber Flat Cap Micro centrifuge Tubes	Starlab	S15-5507
5 ml Polystyrene Round-bottom Tube 12 x 75 mm, steril	Becton Dickinson	352054
1000 – 5000 µl Bulk, Natural Pipette Tips	Starlab	I1009-5000
CASY [®] ton Lösung	Greiner bio-one	43001
Cellstar [®] PP-Test tubes, 15 ml, steril	Greiner bio-one	188271
Cellstar [®] PP-Test tubes, 50 ml, steril	Greiner bio-one	227261
Cellstar [®] Tissue Culture Flasks, 25 cm ² , steril, filter Cap	Greiner bio-one	690175
Cellstar [®] Tissue Culture Flasks, 75 cm ² , steril, filter Cap	Greiner bio-one	658175
Cellstar [®] Tissue Culture Flasks, 175 cm ² , steril, filter Cap	Greiner bio-one	660175
Cellstar [®] Gewebekulturplatte, 96 Well, flacher Boden, steril	Greiner bio-one	655180
FACS – Testtubes	Becton Dickinson	352054
FACSafe TM	Becton Dickinson	340345
FACSFlow TM	Becton Dickinson	342003
FACSRinse TM	Becton Dickinson	340346
Genitacin (G418)	Sigma	G 9516
Fetales Kälberserum	Sigma	F 7524
L-Glutamine 200 mmol/l	Sigma	G 7513
Micro-Assay-Platte, Kaminform, 96 Well, 127, 8/86/15, Schwarz, transparenter Boden	Greiner bio-one	655096
Nährmedium D-MEM; Zusätze: 4500 mg/l Glucose, GlutaMAX TM , Pyruvat)	Gibco	31966-021
Nährmedium RPMI-1640	Sigma	R 8758
Parafilm M	American National	Parafilm M
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma	P 0781
PVDF-Membran	Carl Roth GmbH & Co KG	114110
PS Microplatte 96 Well, nicht steril, flache Form	Greiner bio-one	655098
TipOne 0,1-5 µl Natural Pipette Tips	Starlab	S1111-3000
TipOne 1-200 µl Yellow Pipette Tips	Starlab	S1111-0006
TipOne 101-1000 µl Yellow Pipette Tips	Starlab	S1111-2020
TipOne 0,5-5 ml Natural Pipette Tips	Starlab	S1112-1020

Materialien	Hersteller/Firma	Artikelnummer
Tissue-Culture Dishes, 20 cm Durchmesser	Greiner bio-one	639160
Trypsin-EDTA-Lösung (1x)	Sigma	T 3924
Zellschaber	Greiner bio-one	541070

10.2 Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller/Firma	Artikelnummer
2-Propanol	Riedel-deHäen	34863
Acrylamid-Lösung 30 % (m/V)	Applichem	A3626
Apigenin	Sigma	A8906
BCECF-AM	A.G. Scientific, Inc.	B-1097
Benzbromaron	Sigma	B5774
β -Estradiol-17- β -Glucuronid	Sigma	E1127
Bradford-Reagenz	Sigma	B6916
Brilliant Blau R250	Carl Roth GmbH + Co KG	3862.1
Bovines Serumalbumin (BSA)	Applichem	A0850
BSA – Stammlösung	Sigma	P5369
Buthionsulfoxim (BSO)	Sigma	B2515
Calcein-AM	Calbiochem	206700
Calcein-AM	Sigma	17783
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck	P4901
5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluoresceindiacetat (CDFD)	Sigma	21884
Chinin	Synopharm	1200040-0005
Cisplatin	Sigma	P4394
Cobalt(II)sulfat-heptahydrat	Merck	102546
Cyclosporin A	Sigma	C3662
Daunorubicin-Hydrochlorid	Fluka	30450
D-Glucose-Monohydrat	Merck	1040740500
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Acros	AC19773
Dithiothreitol	Applichem	A2948
Doxorubicin	Fluka	44583
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Aldrich	E2.628-2
Flurbiprofen	Sigma	F8514
Glycerol (wasserfrei)	Applichem	A1123
Glycerol 86 % (V/V)	Grüssing	11014
Glutathion reduziert (GSH)	Sigma	G4251
Glutathion oxidiert (GSSG)	Sigma	G6654
HEPES freie Säure	Applichem	A3707
HEPES-Natriumsalz	Sigma	H7006
Indometacin	Sigma	I7378
Kaliumchlorid	Merck	1.04936
Kaliumdihydrogenphosphat	Applichem	A3095
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck	105833

Chemikalie	Hersteller/Firma	Artikelnummer
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Applichem	A4101
Melsept SF	Braun	18907
Methanol	Merck	107018
MK571	Merck	475874
MTT	Sigma	M2003
2,3-Naphthalendicarboxaldehyd (NDA)	Fluka	70215
Natriumazid	Fluka	71290
Natriumcarbonat	Aldrich	451614
Natriumchlorid	Merck	106404
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem	A2572
Natriumorthovanadat	Aldrich	450243
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Applichem	A4732
Natriumhydroxid Maßlösung 1 mol/l	Grüssing	22195
Natriumsulfat Decahydrat	Fluka	71969
Proteingrößenstandard	Applichem	A3993
Probenecid	Sigma	P8761
Salzsäure 37 % (m/V)	Riedel-deHäen	30721
Salzsäure Maßlösung 1 mol/l	Grüssing	23204
Salpetersäure 65 % (m/V) für HPLC Zwecke	Fluka	84380
Sulfinpyrazon	Sigma	S9509
TEMED	Applichem	A1148
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma	T8657
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS)	Applichem	A2264
Tween® 20	Sigma	63158
Verapamil HCL	Sigma	V4629

10.3 Geräte und Zubehör

Gerätebezeichnung	Hersteller/Firma	Typen-Bezeichnung
Durchflusszytometer	BD Bioscience	FACScalibur™
Blottingapparatur	Bio-Rad	Mini Protean II
Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad	Mini Protean II
Geldokumentationseinheit	Bio-Rad	Versa Doc Imagine System
Scanner	UMAX	Astra 2200
Stromgeber	Life Science Int. GmbH	EC250-90
10 µl Hamiltonspritze	Hamilton Bonaduz AG	701N
100 µl Hamiltonspritze	Ito Corporation	MS*100
Handdispenser	Brand GmbH & Co KG	Handystep
Horizontalschüttler	Hoefer Pharmacia Biotech	Red Rotor

Gerätebezeichnung	Hersteller/Firma	Typen-Bezeichnung
Microplatereader	BMG-Labtech	POLARstar Galaxy
Microplatereader	BMG-Labtech	FLUOstar Optima
Microplatereader	BMG-Labtech	FLUOstar Galaxy
Schüttelthermostat	Eppendorf	Thermomixer comfort
Thermostat	Eppendorf	Thermostat plus
Ultraschallbad	Bandelin	Sonorex Super RK106
Vakuumblock	Carl Roth GmbH Co KG	Dot-Blot T790.1
Vakuumpumpe	Vacuumbrand GmbH & Co KG	PC5
Vortexschüttler	Scientific Industries	Vortex Genie 2
Inkubator	Forma Scientific Inc.	CO ₂ Water Jacketed Incubator
Mikroskop	Carl Zeiss AG	Axiovert 25
Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH	TW12
Zellzähler	Innovatis AG	Casy 1 Modell TT
Tischzentrifuge	Eppendorf AG	5451R Centrifuge
Laborzentrifuge	Beckman Coulter	Avanti J-25
Ausswingrotor	Beckman Coulter	JS-7.5
Festwinkelrotor I	Beckman Coulter	JA-25.50
Zentrifugengläser für JA-25.50	Nalge Nunc Int.	3118-0050
Festwinkelrotor II	Beckman Coulter	JLA-10.500
Zentrifugengläser für JLA-10.500	Beckman Coulter	361690
Magnetrührer	IKA Labortechnik	RCT Basic
pH-Meter	Beckman Coulter	Φ720 pH-Meter
Kalomel pH-Elektrode	Sigma	E6009-1EA
Atom-Absorptionsspektrometer (AAS)	Varian	SpectraAA Zeeman 220
AAS-Atomisator	Varian	GTA 100
AAS-Probengeber	Varian	PSD 100
AAS-Probengefäße	Varian	
AAS-Hohlkatodenlampe	Varian	Pt-UltraAA
AAS-Graphitrohr	Varian	

10.4 CDFD Assay für das MAS des FACS

Im Gegensatz zum Röhrchenassay kann beim FACS im Plate-Modus keine Kinetik (Fluoreszenz-Zeit-Diagramm) aufgenommen werden. Es sind nur sogenannte Einpunktmessungen möglich. Für solche Messungen würden sich Punkte aus dem sogenannten Steady-State oder auch Gleichgewichtszustand anbieten. Dieser ist erreicht, wenn die Sättigungskurven des Fluoreszenz-Zeit-Diagrammes ihr Maximum erreicht haben. An dieser Stelle sind Einstrom und

Ausstrom gleich und bleiben über einen längeren Zeitraum konstant. Beim Daunorubicin Influx-Assay, stellt dies in der Regel kein Problem dar, da keine Umsetzung des Daunorubicins erfolgt [198]. Beim CDFD-Assay kommt zusätzlich eine Enzymreaktion hinzu. Nach einiger Zeit wird das Substrat, in diesem Fall das CDFD aufgebraucht sein und die Umsetzung zum CDF zum Erliegen kommen. Daher war es nötig zu überprüfen, ob die intrazelluläre Fluoreszenz über den Messzeitraum konstant bleibt. Als erstes musste also festgestellt werden, wie lange es dauert, bis die Zellen den Gleichgewichtszustand zwischen Influx von CDFD und Efflux von CDF und CDFD erreicht haben. Wobei anzumerken bleibt, dass im Gegensatz zum Calcein-AM das bevorzugte Substrat die anionische Form, das CDF, darstellt [94]. Der zweite Schritt bestand darin, die Konstanz der Fluoreszenzwerte über den Messzeitraum von ca. 2 h zu gewährleisten. In Abbildung 19 ist ein Fluoreszenz-Zeit-Diagramm für den Zeitraum von 4 h dargestellt, welches mit Hilfe eines Röhrchen Versuches aufgenommen wurde. Es zeigt, dass die Fluoreszenz über den Messzeitraum relativ konstant bleibt und es möglich war die Messung mit Hilfe des MAS durchzuführen. Anzumerken bleibt, dass die Wildtypzellen nicht komplett den Steady-State erreichten und ein geringer Fehler in Kauf genommen werden musste.

Als Standardsubstanz bot sich wieder Indometacin als Modulator der CDF-Fluoreszenz an, da es schon im Röhrchen-Versuchen die beste inhibitorische Aktivität unter den Standardinhibitoren zeigte.

In Abbildung 100 ist exemplarisch eine Dosis-Wirkungskurve der gemessenen maximalen Fluoreszenzwerte gegen den Logarithmus der eingesetzten Modulatorkonzentration aufgetragen. Es ergab sich ein typischer, sigmoidaler Kurvenverlauf, der wieder mit Hilfe der Vier-Parameter-Logistische-Gleichung gefittet wurde.

Auffällig ist, dass auch im WT ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz in Form einer Dosis-Wirkungs-Kurve zu erkennen ist. Unerwartet war dies nicht, da auch andere Transporter in Nierenzellen exprimiert werden [112]. Des Weiteren wurde das MAS mittels Lüftungsheizung auf 37 °C aufgeheizt. Dadurch kam es zu Verdunstungen. Der Wildtyp wurde immer im unteren Bereich der Platte eingefüllt, damit dieser aufgrund seiner etwas langsameren Kinetik in den Steady-State kam. Dort war natürlich die Verdunstung am höchsten, was wiederum zur Aufkonzentration des Fluoreszenzfarbstoffes führte und somit auch zur Fluoreszenzerhöhung. Diese Aufkonzentration könnte ein zusätzlicher Grund für den deutlichen Anstieg auch im Wildtyp sein.

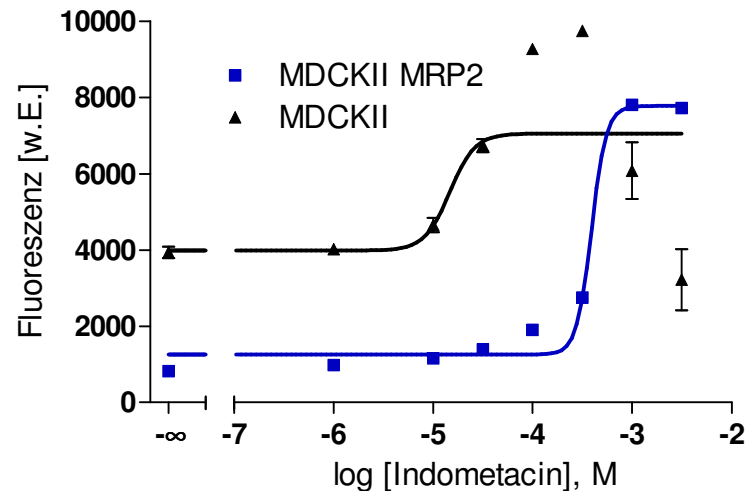


Abbildung 100: Exemplarische Dosis-Wirkungskurve für Indometacin im CDFD Assay fürs FACS. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung von einem typischen Experiment mit drei Replikaten aus einer Serie von $n > 3$ unabhängigen Versuchen.

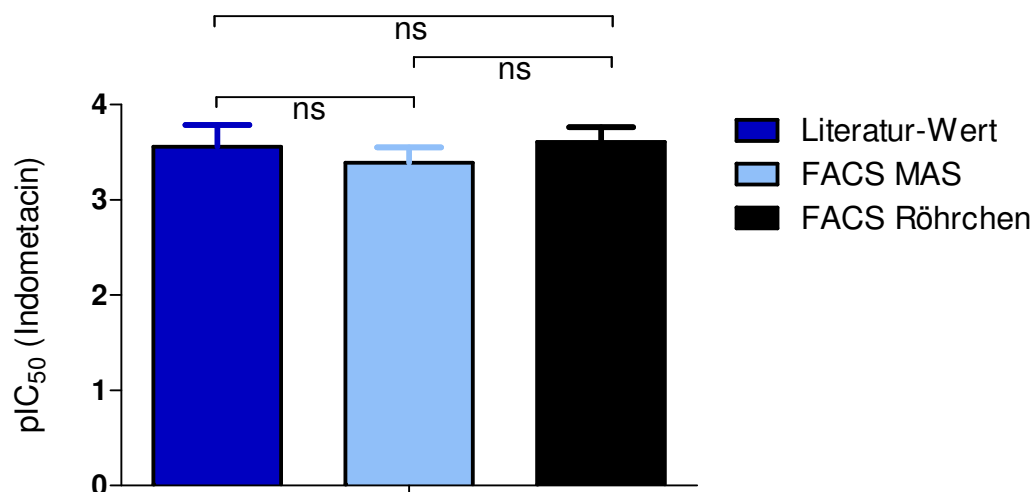


Abbildung 101: Vergleich der Mittelwerte (t -test) der gemessenen pIC_{50} -Werten für Indometacin miteinander sowie mit dem Literaturwert aus [129]. Alle pIC_{50} -Werte sind nicht signifikant (ns) verschieden ($p < 0,05$).

In Abbildung 101 sind die gemessenen Daten für Indometacin aufgeführt und die IC_{50} -Werte mit denen aus den Röhrchenversuchen mittels t -test verglichen worden. Aus den Daten der Abbildung und den darin enthaltenen t -test Ergebnissen wird deutlich, dass die beiden Assays nicht signifikant unterschiedliche Ergebnisse liefern.

Vorteil des Assays in 96er-Platten ist, dass mehrere Substanzen gleichzeitig vermessen werden können. Aufgrund der Einstellungsmöglichkeiten des FACS werden des Weiteren nur lebende Zellen vermessen, sodass auch noch leicht toxische Verbindungen charakterisiert werden können. Der größte Nachteil ist, dass keine Kinetik aufgenommen werden kann und Ergeb-

nisse durch nicht erkannte Messfehler verfälscht werden können. Weitere Nachteile sind die sehr lange Inkubationszeit von 2 h sowie die sehr lange Messzeit von ebenfalls 2 h. Aus diesem Grund wurde nach weiteren Methoden gesucht, die die Vorteile beider Versuchsdurchführungen in sich vereinen. Durch die Etablierung des Calcein-AM-Assays für MRP2 konnte dies auch erreicht werden (vergl. Kapitel 4.3.5).

10.5 Daunorubicin-Efflux-Assays

10.5.1 Daunorubicin-Efflux-Assay für ABCB1 und MRP2

Der Daunorubicin-Efflux-Assay ist eine Abwandlung des Daunorubicin Influxassays für das FACS-Gerät und wurde für das Zelllinienpaar A2780 und A2780 ADR im Arbeitskreis etabliert. Aus diesem Grund wurden die ersten Versuche mit A2780 ADR und Wildtyp-Zellen nach dessen Protokoll durchgeführt [114].

Der Daunorubicin-Efflux-Assay hat den Vorteil gegenüber dem Influx-Assay, dass eine gesamte Kinetik aufgenommen werden kann, während es beim FACS im Plattenmodus nur möglich ist eine Momentaufnahme im Steady-State (Gleichgewichtszustand) aufzunehmen. Das Prinzip des Assays beruht darauf, dass sich Daunorubicin bei 480 nm anregen lässt und bei 520 nm fluoresziert. Diese Eigenschaft verliert es allerdings, wenn es in DNA interkaliert [199]. Nach Zugabe von Thymus-DNA sollte extrazellulär die gesamte Daunorubicin-Fluoreszenz gelöscht werden, sodass nur noch die intrazelluläre Fluoreszenz messbar ist. In Abbildung 102 sind beispielhaft drei Konzentrationen des bekannten Modulators Verapamil [26] und ihr Effekt auf den Daunorubicin-Efflux dargestellt.

Die jeweiligen Grundfluoreszenzen im Puffer mit der entsprechenden Verapamil-Konzentration wurden von den Messwerten abgezogen, weshalb es auch zu negativen Fluoreszenzwerten kommen konnte. Ein Teil des Daunorubicins wird durch Einlagerung in die DNA der verwendeten Zelllinien eingelagert und dadurch gequencht. Die Differenz zwischen den Fluoreszenzwerten von 0 und der Vollinhibition (in diesem Fall einer Konzentration von 316 $\mu\text{mol/l}$ Verapamil) stellt also ein Maß für die Daunorubicinmenge dar, die interkaliert in der Zell-DNA vorliegt [199].

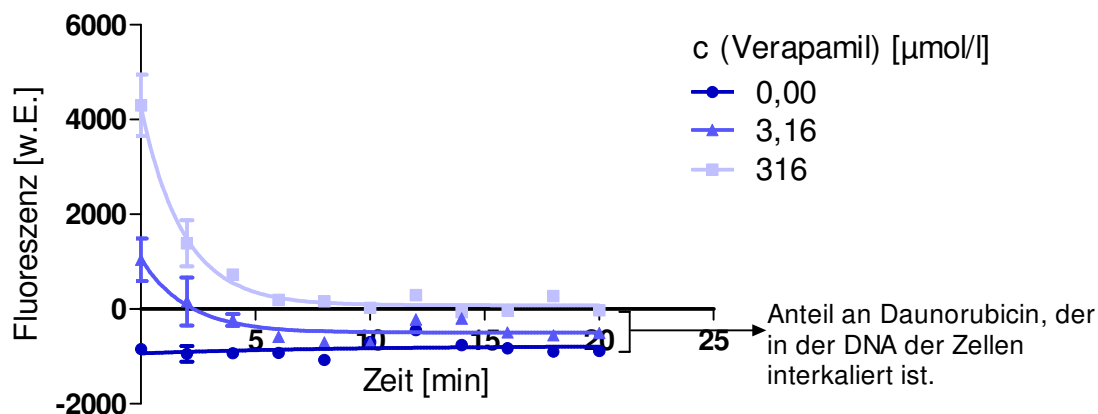


Abbildung 102: Fluoreszenz-Zeit-Diagramme für die Zelllinie A2780 ADR mit verschiedenen Verapamilkonzentrationen. Mit zunehmender Modulatorkonzentration sinkt die Daunorubicin-Fluoreszenz

Wie beim Influx-Assay stellt sich auch hier ein Gleichgewicht zwischen Influx und Efflux in Abhängigkeit von der Modulatorkonzentration ein. Durch Quenchen des Daunorubicins im Medium, kann spezifisch die intrazelluläre Fluoreszenz detektiert werden. Beim Aufrufen der Steigung des hinteren abfallenden Teils der Kurve gegen die logarithmische Konzentration, wird der in Abbildung 103 gezeigte typische sigmoidale Verlauf einer Dosis-Wirkungskurve erhalten.

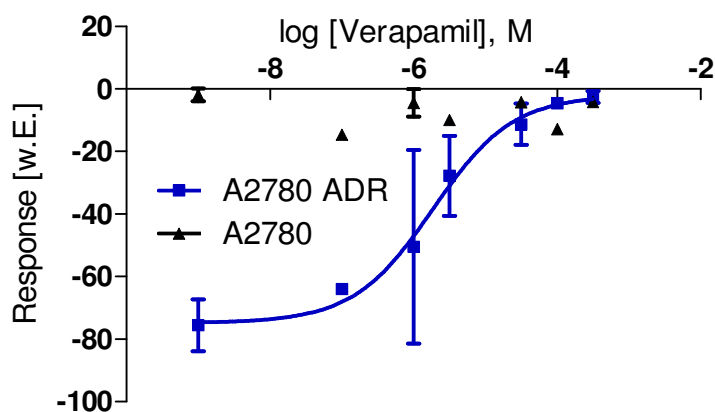


Abbildung 103: Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve aus dem Daunorubicin-Efflux-Assays für Verapamil in A2780 ADR und Wildtypzellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung eines typischen Experiments einer Doppelbestimmung aus einer Serie von 2 unabhängigen Versuchen.

Der ermittelte IC_{50} -Wert von $2,391 \pm 1,940$ entspricht denen in der Dissertation von Dr. Müller und Dr. Meyer [95, 198, 200], sodass davon ausgegangen werden kann, dass vergleichbare Werte erhalten werden. Wird der gleiche Versuch in MDCKII MRP2 Zellen und dem korrespondierenden Wildtyp mit Indometacin durchgeführt, so ergibt sich die in Abbildung 104 dar-

gestellte Dosis-Wirkungskurve. Im Gegensatz zu dem Versuch im A2780-Zelllinienpaar, zeigt hier der Wildtyp ebenfalls einen deutlichen Effekt, der auch beim CDFD-Assay (Kapitel 10.4) und beim Calcein-AM-Assay (Kapitel 4.3.5) zu sehen ist und wahrscheinlich auf nativ exprimierte Transporter zurückzuführen ist.

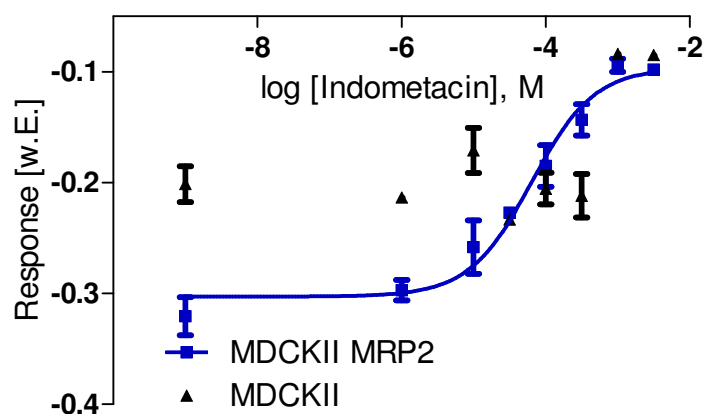


Abbildung 104: Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve aus dem Daunorubicin-Efflux-Assays für Indometacin in MDCKII MRP2 und Wildtypzellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments einer Doppelbestimmung aus einer Serie von 2 unabhängigen Versuchen.

Beim Vergleich des erhaltenen pIC_{50} -Wert $4,193 \pm 0,120$ (entspricht $IC_{50} = 65,76 \pm 18,00 \mu\text{mol/l}$) mit denen für den CDFD-Assay und dem Calcein-AM-Assay, so fällt auf, dass er deutlich niedriger liegt. Dies könnte daran liegen, dass Daunorubicin durch Indometacin anders beeinflusst wird als die auf die Grundstruktur des Fluorescein basierenden Fluoreszenzfarbstoffe CDFD und Calcein-AM (vergl. Abbildung 101 und Tabelle 29).

10.6 Weitere 3D-QSAR-Modelle für die LM-Verbindungen

Neben den in Kapitel 4.5.2 diskutierten Modellen, gibt es auch noch andere auf die CoMFA basierende Konturdiagramme, die die Eigenschaften der biologischen Daten mit einem $q^2 \geq 0,6$ widerspiegeln können. Diese werden in den folgenden Abbildungen zur Ansicht dargestellt.

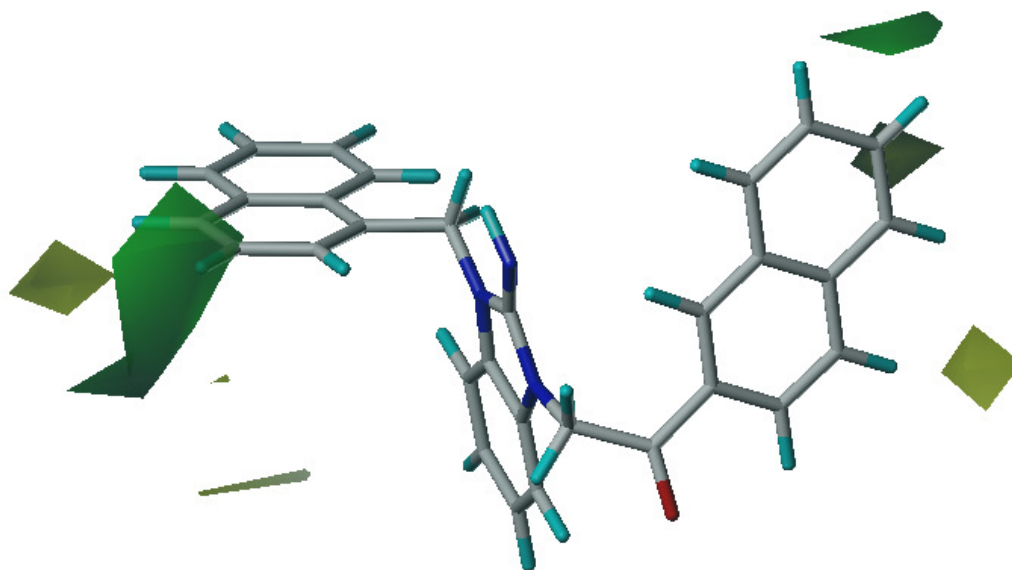


Abbildung 105: Graphische Auswertung des erhalten CoMFA-Modells für MRP1 auf Basis der sterischen Eigenschaften der Moleküle. Eingebettet ist LM 20.5, die beste Testsubstanz im Assay. Gelb: sterisch ungünstig; grün: sterisch begünstigt.

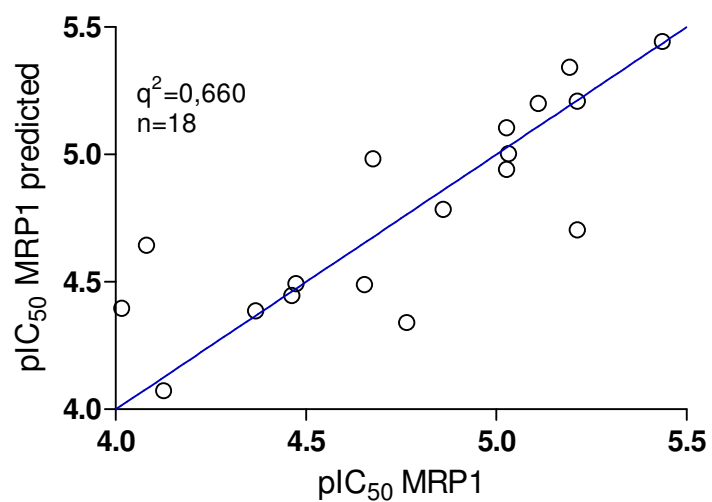


Abbildung 106: Korrelation zwischen gemessenen und durch das sterische LOO-CoMFA-Modell für die jeweils weggelassenen Verbindung vorhergesagten pIC_{50} -Werte für MRP1.

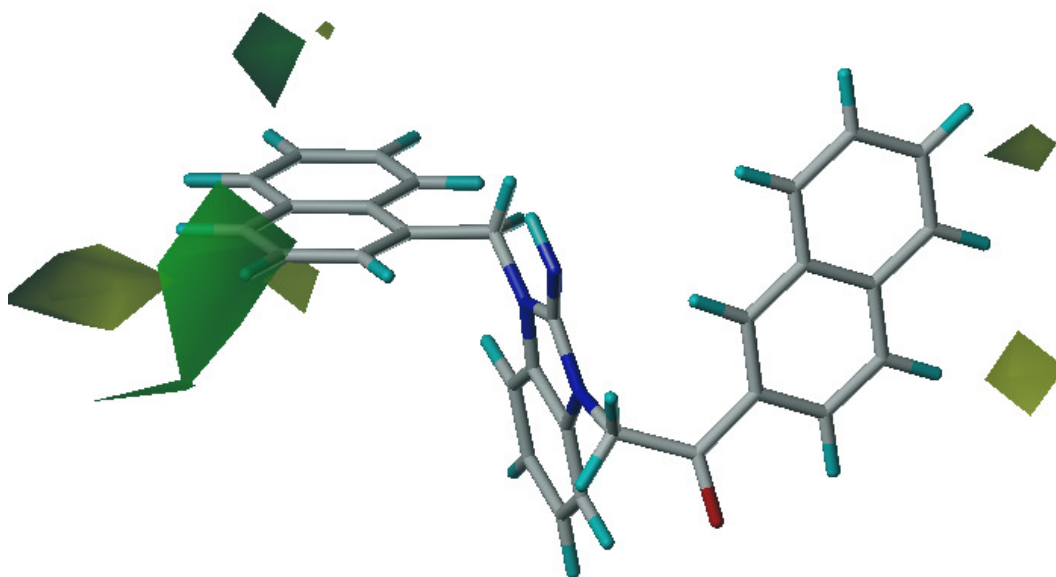


Abbildung 107: Graphische Auswertung des erhalten CoMFA-Modells für MRP2 auf Basis der sterischen Eigenschaften der Moleküle. Eingebettet ist LM 20.5, die beste Testsubstanz im Assay. Gelb: sterisch ungünstig; grün: sterisch begünstigt.

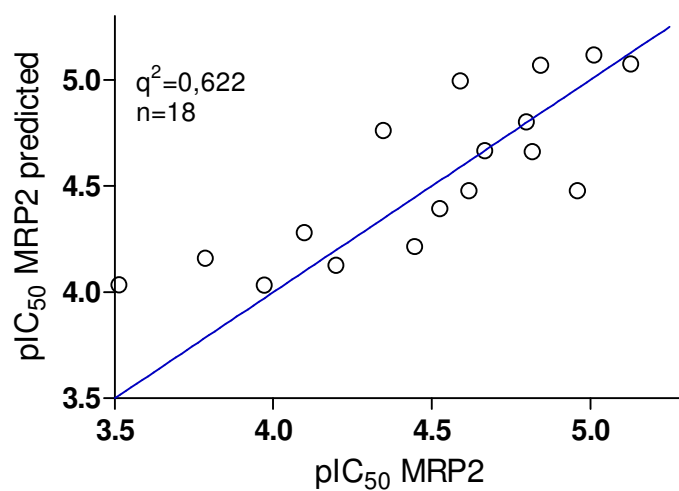


Abbildung 108: Korrelation zwischen gemessenen und durch das sterischen LOO-CoMFA-Modell für die jeweils weggelassenen Verbindung vorhergesagten pIC_{50} -Werte für MRP2.

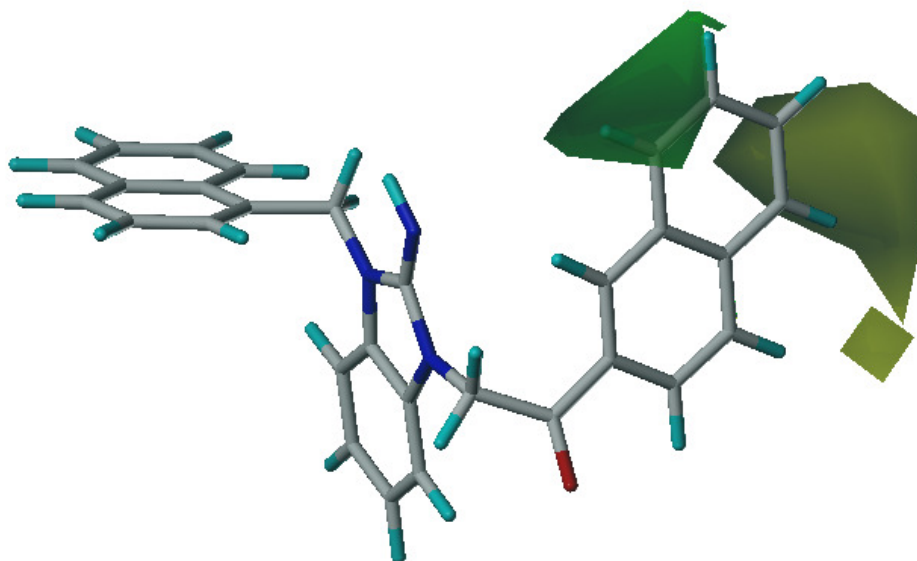


Abbildung 109: Graphische Auswertung des erhalten CoMFA-Modells für ABCB1 auf Basis der sterischen Eigenschaften der Moleküle. Eingebettet ist LM 20.5, die beste Testsubstanz im Assay. Gelb: Sterisch ungünstig; grün: sterisch begünstigt.

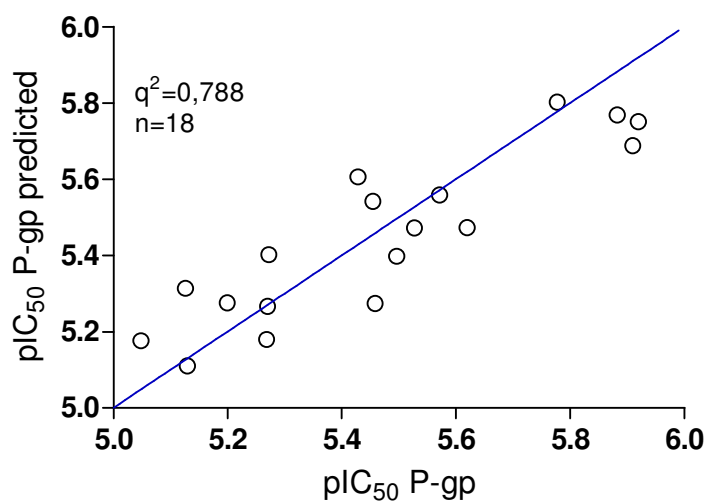


Abbildung 110: Korrelation zwischen gemessenen und durch das sterische LOO-CoMFA- Modell für die jeweils weggelassenen Verbindung vorhergesagten pIC₅₀-Werte für ABCB1.

10.7 Zytotoxizitätstest ausgewählter Modulatoren

Um die Toxizität der LM- bzw. der Gü-Verbindungen zu untersuchen wurden verschiedene Konzentrationen ausgewählter Substanzen im MTT-Assay (Kapitel 3.14) untersucht und ins Verhältnis zum Standard ohne Modulator gesetzt. Als Zellsystem wurde die 2008 WT-Zelllinie verwendet. Die Ergebnisse sind für die ausgewählten LM-Verbindungen in Abbildung 111 und für die Gü-Verbindungen in Abbildung 112 dargestellt.

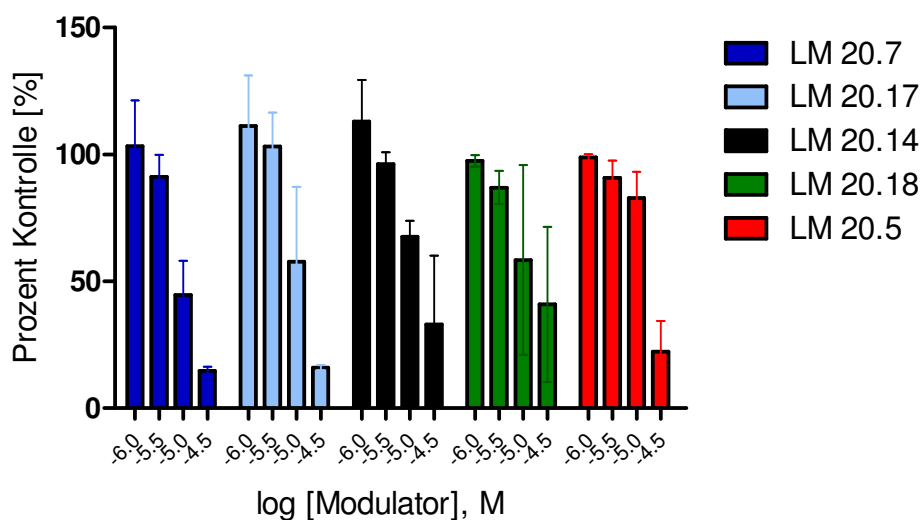


Abbildung 111: Zytotoxizitäts-Ergebnisse ausgewählter LM-Verbindungen. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung von n=2 Experimenten als Doppelbestimmung.

Die getesteten LM-Verbindungen besitzen alle eine IC_{50} um ca. $14 \mu\text{mol/l}$ und sind bis zu einer Konzentration von $5 \mu\text{mol/l}$ untoxisch. Bei höheren Konzentrationen kommt es hingegen zum schnellen Absterben. Im Gegensatz dazu zeigen die untersuchten Gü-Verbindungen bis zur höchsten gemessenen Konzentration von $31,6 \mu\text{mol/l}$ keine Anzeichen einer Toxizität (Abbildung 112).

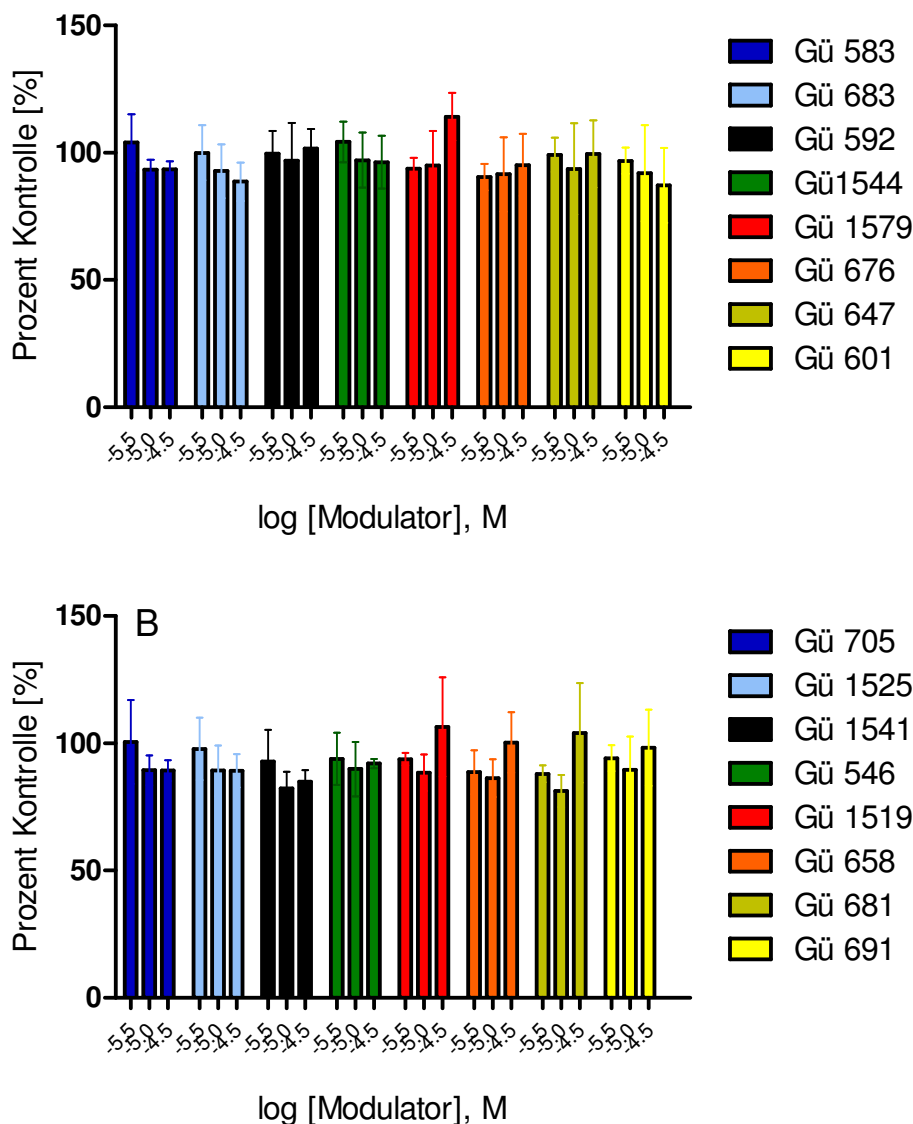


Abbildung 112: Zytotoxizitäts-Ergebnisse ausgewählter Gü-Verbindungen (A,B). Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung von n=2 Experimenten jeweils als Doppelbestimmung.

10.8 Aktivität der Gü-Verbindungen an ABCB1

Einige der in Kapitel 4.6 diskutierten Gü-Verbindungen wurden auf ihre modulatorischen Eigenschaften gegenüber ABCB1 untersucht, darunter alle Gü-Verbindungen, die einen $IC_{50} \leq 10 \mu\text{mol/l}$ an MRP1 besaßen. Die Ergebnisse des Screenings sind in den folgenden Abbildungen wiedergegeben. Bis auf Gü 1545 und Gü 1544 weisen keine der getesteten Carbonsäuren eine inhibitorische Wirkung gegenüber ABCB1 auf. Gü 1544 und Gü 1545 besitzen beide einen ankondensierten Phenylring in ortho-Stellung zum Schwefel des Thiophenrings.

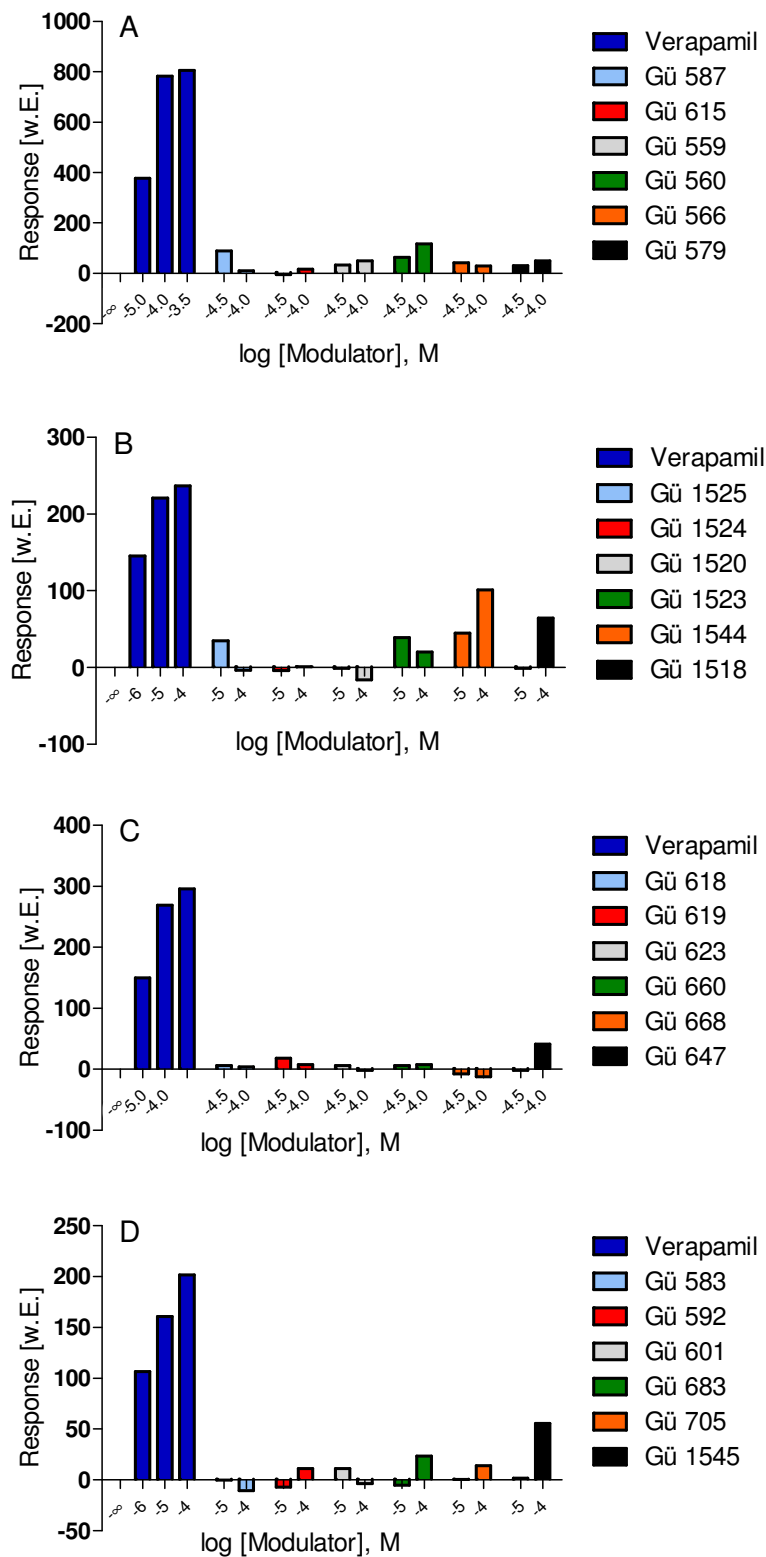
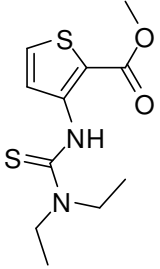
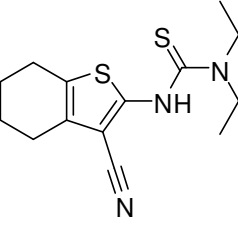
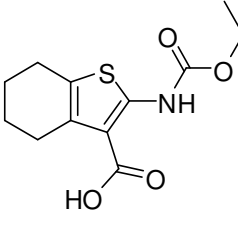
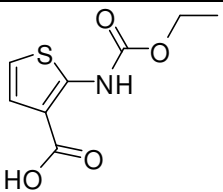
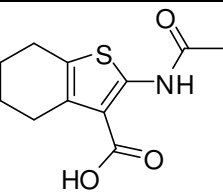
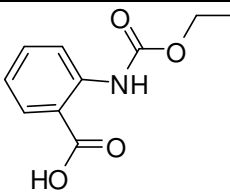
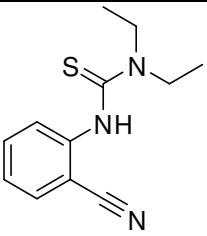
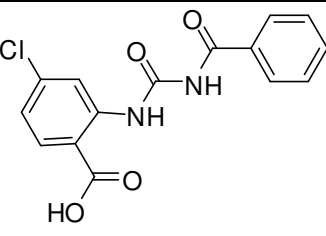
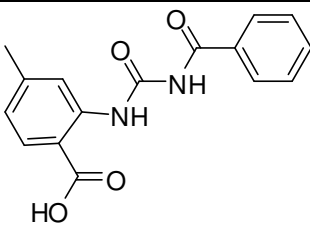


Abbildung 113: Aktivität der Gü-Verbindungen an P-gp (A-D) im Vergleich zum Standard Verapamil. Abgebildet ist der Mittelwert eines typischen Experiments mit zwei Replikaten.

10.9 Auswahl unwirksamer Gü-Verbindungen

In Tabelle 48 sind ausgewählte inaktive Gü-Verbindungen dargestellt. Weitere befinden sich in der Diplomarbeit von Frau Apothekerin Jeanette Wiendlocha [142].

Tabelle 48: Auswahl unwirksamer Gü-Verbindungen aus [142]

		
Gü 642	Gü 266	Gü 509
		
Gü 548	Gü 6	Gü 317
		
Gü 378	Gü 425	Gü 319

10.10 Testung von Phenylannolon 150E aus *Myxobacterium Nannocystis exedens*

In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ohlendorf wurde eine von ihr aus dem *Myxobacterium Nannocystis exedens* extrahierte Substanz 150E (vergl. Abbildung 114) auf ihre biologische Aktivität in ABCB1 exprimierenden Zellen untersucht. Grundlage einer Aktivitätsannahme bildet eine Veröffentlichung einer Arbeitsgruppe um Andrus, die Polyene als neue Inhibitoren für ABCB1 postulierten [201]. Leider eignete sich die Substanz aufgrund ihrer Quenchingeigenschaften nicht zur direkten Messung in einem Calcein-AM basierten Akkumu-

lationsassay, sodass auf eine indirekte Messmethode, den MTT-Assay zurückgegriffen werden musste.

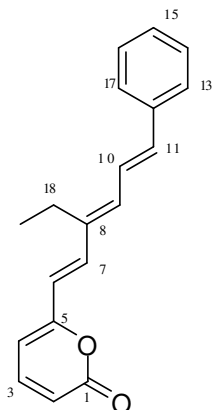


Abbildung 114: Strukturformel von 150E.

Zunächst wurde die Toxizität von 150E im MTT-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 115 dargestellt. Bis zu einer relativ hohen Konzentration größer als 31,6 $\mu\text{mol/l}$ ist 150E untoxisch sowohl für den Wildtyp als auch für die ABCB1 exprimierende Zelllinie.

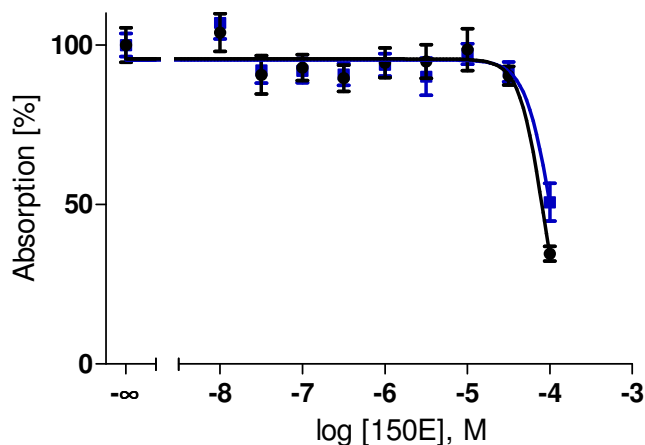


Abbildung 115: Dosis-Wirkungskurve von 150E im MTT-Assay in A2780 ADR (■) und A2780 (●). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Für Daunorubicin, das ein bekanntes Substrat für ABCB1 darstellt [202], zeigten sich unterschiedliche IC_{50} -Werte für die A2780 ADR Zelllinie 13,3 $\mu\text{mol/l}$ und für den Wildtyp 0,092 $\mu\text{mol/l}$. Daraus lässt sich schließen, dass die A2780 ADR Zelllinie ungefähr 145mal resistenter gegenüber Daunorubicin ist als der entsprechende Wildtyp. In einer Kombination

aus verschiedenen Daunorubicin-Konzentrationen und einer fixen Konzentration an 150E (31,6 $\mu\text{mol/l}$) konnte der Effekt der Testsubstanz auf die Resistenz untersucht werden.

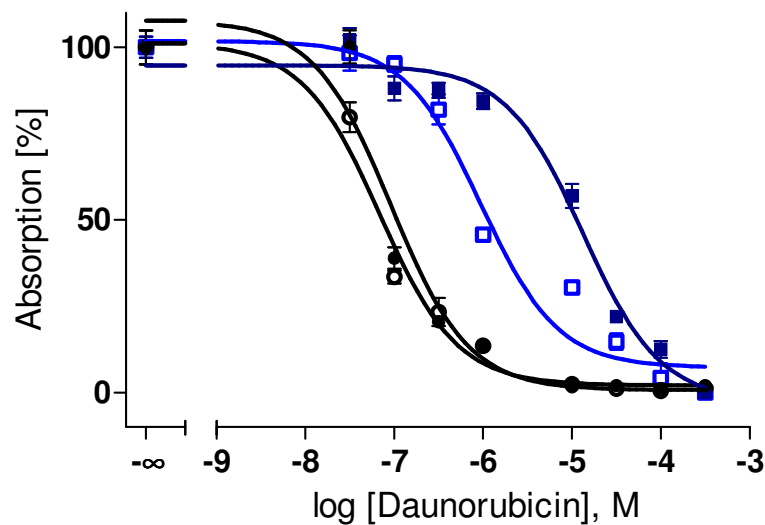


Abbildung 116: Dosis-Wirkungskurve von 150E im MTT-Assay in A2780 ADR (■) und A2780 (●) in Anwesenheit (offene Symbole) oder Abwesenheit (geschlossene Symbole) von 150E. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler eines typischen Experiments mit 3 Replikaten aus einer Serie von 3 unabhängigen Experimenten.

In Anwesenheit von 150E konnte der IC_{50} -Wert von Daunorubicin an der A2780 ADR Zelllinie auf $9.46 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ erniedrigt werden, während der Wert für den Wildtyp nahezu unverändert blieb ($\text{IC}_{50} = 6.86 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l}$). Der Resistenzfaktor wurde ungefähr um den Faktor 10 von 145 auf 14,1 verringert. Das entspricht ungefähr der Reduktion, die mit Modulatoren der dritten Generation, wie etwa Tariquidar erreicht werden kann [202]. 150E könnte also eine neue Leitstruktur zur Entwicklung von Modulatoren gegen den Multidrug-Resistenzen-Phänotyp sein. Im Gegensatz zu den in [201] beschriebenen Polyenen zeigte 150E nur eine sehr geringe Zytotoxizität, was ihr einen Vorteil gegenüber diesen Substanzen gibt.

11 Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Originalarbeiten

Leyers, S.; Moellmann L.; Wiese M. Synthesis of 2-imino-2,3-dihydro-benzimidazole derivatives as Modulators of MRP1 and MRP2, structure activity relationships and 3D-QSAR evaluation. **2009** (in Bearbeitung).

Leyers, S.; Häcker, H. G.; Wiendlocha, J.; Gütschow, M.; Wiese, M. A 4-aminobenzoic acid derivative as novel lead for selective inhibitors of multidrug resistance-associated proteins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4761-4763.

Ohlendorf, B.; Leyers, S.; Krick, A.; Kehraus, S.; Wiese, M.; König, G. M. Phenylannolones A-C: biosynthesis of new secondary metabolites from the myxobacterium *Nannocystis exedens*. *Chembiochem.* **2008**, *9*, 2997-3003.

Häcker, H. G.; Leyers, S.; Wiendlocha, J.; Gütschow, M.; Wiese, M. Aromatic 2-(Thio)ureidocarboxylic acids as MRP1 modulators: Synthesis, biological evaluation and identification of a pharmacophore pattern. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4586-4595.

Abstrakta/Kongressbeiträge

Leyers, S.; Moellmann, L.; Wiese, M. An Enzyme Kinetic Approach for Identifying Binding Sites in Multidrug Resistance Associated Protein 2. *DPhG Jahrestagung 2008, Bonn*, Poster.

Leyers, S.; Moellmann, L.; Wiese, M. Novel 2-imino-2,3-dihydro-benzimidazole Derivatives as Novel Inhibitors of MRP2 and Their Allosteric Interaction with Beta-Estradiol-17-(beta-D-glucuronide). *FEBS Special Meeting 2008, Innsbruck*, Poster.

Häcker, H. G.; Leyers, S.; Wiendlocha, J.; Wiese, M.; Gütschow, M. Aromatic 2-(Thio)ureidocarboxylic Acids as Novel Inhibitors of MRP1. *DPhG Jahrestagung 2008*, Poster.

Leyers, S.; Wiendlocha, J.; Häcker, H. G.; Gütschow, M.; Wiese, M. Relevance of MRP2 in Cisplatin Resistance and Identification of Novel Inhibitors of MRP1 and MRP2. *DPhG Jahrestagung 2007, Erlangen*, Poster.

Jekerle, V.; Christlieb, M.; Leyers, S.; Klinkhammer, W.; Piquette-Miller, M.; Wiese, M. Novel Antranilic Acid Bases Multidrug Resistance Modulators with Different Effects on P-glycoprotein, BCRP and MRPs. *FEBS Special Meeting 2006*, Poster.